

Totalsynthese von Cyclosporin A an der Festphase

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines
Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Andreas Gerber

aus Langnau im Emmental (BE)

Basel, 2009

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität
der Universität im Auftrag von

Prof. Dr. Bernd Giese

Prof. Dr. Helma Wennemers

Basel, den 09. Dezember 2008

Prof. Dr. Eberhard Parlow
(Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Giese in der Zeit von März 1998 bis April 2003 am Institut für Organische Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernd Giese danke ich für die Aufnahme in seine Gruppe, für anregende Diskussionen und insbesondere für die finanzielle Unterstützung zum Ende der Dissertation.

Herrn Dr. Roland Wenger danke ich für die sehr grosse Unterstützung während der gesamten Dissertationszeit und seinen Einsatz, der es mir erst ermöglicht hat in Zusammenarbeit mit der Firma Novartis dieses interessante Themengebiet zu bearbeiten.

Der Firma Novartis danke ich für die Finanzierung der vorliegenden Arbeit.

Frau Prof. Dr. Helma Wennemers danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Henri Mattes (Novartis AG) danke ich für die Unterstützung und die interessanten Diskussionen während meiner Zeit in seinem Labor.

Herrn Dr. Klaus Kulicke danke ich für die grosszügig gewährte Hilfe bei Fragestellungen hinsichtlich der NMR-Spektroskopie.

Dr. Markus Obkircher, Dr. Kerstin Rebscher, Dr. Martin Spichty, Dr. Christian Stähelin und Dr. Roland Wenger danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Allen Mitgliedern der Gruppe Giese danke für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima.

Für meine Eltern und Kerstin
In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen	I
1 Einleitung	1
1.1 Cyclosporin	1
1.1.1 Einführung	1
1.1.2 Struktur	3
1.1.3 Konformationen von Cyclosporin A	6
1.1.4 Synthese von Cyclosporin A	7
1.1.4.1 Biosynthese	7
1.1.4.2 Totalsynthese	8
1.1.5 Wirkungsweise von CsA	13
1.1.5.1 Immunsuppression	14
1.1.5.2 Wirkungsweise von Calcineurininhibitoren	14
1.1.5.3 Nebenwirkungen von CsA	15
1.1.6 Struktur-Aktivitäts-Beziehung	16
1.2 Kombinatorische Chemie und Festphasensynthese	19
1.2.1 Einführung	19
1.2.2 Kombinatorische Chemie in der Wirkstoffsuche	19
1.2.3 Kombinatorische Ansätze in der Festphasenchemie	22
1.2.3.1 Das Trägerharz	24
1.2.3.2 Der Linker	25
1.2.4 Festphasensynthese von Cyclosporinen	30
1.2.4.1 Kombinierte Synthese von Cyclosporinen	30
1.2.4.2 Komplette Synthese an der Festphase	31
2 Aufgabenstellung	33
3 Untersuchungen zur Synthese eines geeigneten Linkers in homogener Phase	34
3.1 Einleitung	34

3.2	Aus der Literatur bekannte Linker zur Immobilisierung und Freisetzung von Hydroxygruppen.....	35
3.2.1	Trityl- /2-Chlorotrityl-Linker.....	35
3.2.2	Tetrahydropyran-Linker	35
3.2.3	Wang-Linker	36
3.2.4	O-Nitrobenzyl-Linker	36
3.2.5	Phenylacetyl-Linker	37
3.2.6	Thioester-Linker.....	37
3.3	Synthese der Linkermodellverbindungen	39
3.3.1	Synthese des an MeBmt gebundenen Linkervorläufers	39
3.3.2	Kupplung des Linkervorläufers auf Amine.....	41
3.4	Spaltung der Modellverbindungen in homogener Phase.....	42
3.4.1	Methylierungsbedingungen für den Linker	43
3.4.2	Spaltung der Modellsubstanzen	44
4	Untersuchungen zur Synthese eines Linkers an der Festphase	47
4.1	Einleitung	47
4.2	Trägermaterial	47
4.3	Spacer	49
4.3.1	Synthese der verwendeten Spacerverbindungen	49
4.3.2	Beladung der Festphasenlaternen mit Spacern	50
4.4	Beladung der Laternen mit der ersten Aminosäure MeBmt	52
4.4.1	Beladung mit Boc-MeBmt-OH.....	52
4.5	Abspaltung von Boc-MeBmt-OtBu von der Festphase.....	53
4.5.1	Untersuchungen zur Spaltlösung	54
4.5.2	Untersuchung der Aktivierungsbedingungen	55
4.5.3	Untersuchung des Spacer-Einflusses auf die Abspaltung	56
4.6	Abspaltung von Fmoc-MeBmt-OtBu von der Festphase	57
4.6.1	Synthese des Vorläufers zur Beladung	57
4.6.2	Beladung mit Fmoc-MeBmt-OtBu.....	58
4.6.3	Abspaltung von Fmoc-MeBmt-OtBu	59
4.7	Zusammenfassung	59
5	Aufbau der Peptidkette von Cyclosporin	61

5.1	Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu	61
5.1.1	Herstellung durch klassische Festphasensynthese	61
5.1.2	Synthese durch N-Methylierung von Valin an der Festphase.....	62
5.1.3	Untersuchung zur Stabilität des Linkersystems.....	65
5.1.4	Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu als Vorläufer für die Kupplung an die Festphase.....	66
5.1.5	Kupplungs- und Abspaltungstests mit dem Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu Vorläufer...	68
5.1.5.1	Beladung der Laternen mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu	68
5.1.5.2	Abspaltung von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu.....	69
5.1.5.3	Abspaltung von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu	70
5.1.6	Zusammenfassung	71
5.2	Festphasensynthese des Hexapeptids	72
5.2.1	Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH	72
5.2.2	Festphasensynthese des Hexapeptids Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (122).....	75
5.2.2.1	Aufbau des Hexapeptids unter Verwendung von BEP als Kupplungsreagens	75
5.2.2.2	Aufbau des Hexapeptids unter Verwendung von DIC/HOAt als Kupplungsreagenz	76
5.3	Synthese des Undecapeptids	77
5.3.1	Synthese des linearen Undecapeptids Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (133) in Lösung.....	78
5.3.2	Synthese des linearen Undecapeptids Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (133) an der Festphase	80
5.4	Cyclisierung der linearen Vorläufer	82
5.4.1	Cyclisierung der Modellverbindung.....	82
5.4.1.1	Beladung der Festphasenlaternen mit Undecapeptid 134	82
5.4.1.2	Optimierung der Abspaltungs- und Cyclisierungsbedingungen.....	83
5.5	Cyclisierung des an der Festphase synthetisierten Undecapeptids von CsA	88
6	Synthese von Cyclosporin A-Derivaten	89
6.1	Synthese der linearen Undecapeptide	89
6.2	Cyclisierung der an der Festphase synthetisierten Derivate	90

7	Zusammenfassung der Resultate	91
7.1	Linker/Spacer.....	91
7.2	Aufbau des linearen Undecapeptids	93
7.3	Cyclisierung des linearen Undecapeptids	93
7.4	Synthese von Cyclosporin A-Derivaten.....	94
7.5	Ausblick.....	95
8	Vorbemerkungen	99
8.1	Physikalische Daten	99
8.2	Chromatographische Methoden.....	100
8.3	Chemikalien, Lösungsmittel und Festphase.....	101
9	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) im Umgang mit den verwendeten Festphasenlaternen	103
10	Bestimmung der Beladung der Festphase	104
10.1	Quantifizierung der Fmoc-Abspaltung (BBV1).....	104
10.2	Quantifizierung der freien Aminogruppen (BBV2)	104
11	Synthese der Linkervorläufer	105
11.1	Synthese von Boc-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (60)	105
11.2	Synthese von Fmoc-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (87).....	109
11.3	Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (101).....	115
11.4	Synthese des linearen Undecapeptids Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val- MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (134)	124
12	Synthese der Modellverbindungen für die Untersuchungen in Lösung	138

12.1	Synthese von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-benzylmethylaminoacetox-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (63)	138
12.2	Synthese von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-[(3-benzylcarbamoyl-propyl)-methyl-aminoacetox]-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (69)	139
13	Spaltung der Modellverbindungen in homogener Phase	145
13.1	Aktivierung und Spaltung von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-benzylmethylaminoacetox-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (63)	145
13.2	Aktivierung und Spaltung von von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-[(3-Benzylcarbamoyl-propyl)-methylaminoacetox]-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (69)	146
14	Beladung der Laternen	148
14.1	Derivatisierung der eingesetzten Laternen.....	148
14.2	Beladung der derivatisierten Laternen	152
14.2.1	Beladung mit Boc-MeBmt-OtBu	152
14.2.2	Beladung mit Fmoc-MeBmt-OtBu.....	153
14.2.3	Beladung mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu.....	155
14.2.4	Beladung mit linearem Undeca-peptid.....	157
15	Aufbau der Peptidkette	158
15.1	Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Dipeptid)	158
15.1.1	Direkte Synthese durch Kupplung von Fmoc-MeVal-OH	158
15.1.2	Indirekte Synthese durch Kupplung von Fmoc-Val-OH und anschliessende N-Methylierung an der Festphase.....	160
15.2	Synthese von Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Tripeptid)	161
15.2.1	Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH auf ein an der Festphase aufgebautes Dipeptid.	161

15.2.2	Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH auf an die Festphase immobilisierten Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu Vorläufer	162
15.3	Synthese von Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Hexapeptid)	164
15.3.1	Synthese unter Verwendung von BEP als Kupplungsreagens.....	164
15.3.2	Synthese unter Verwendung von DIC/HOAt als Kupplungsreagens	165
15.4	Synthese von Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Undecapeptid)	166
16	Abspaltung von der Festphase	168
16.1	Abspaltung von Boc-MeBmt-OtBu	168
16.1.1	Untersuchung der Spaltlösung.....	168
16.1.2	Untersuchung der Aktivierungsbedingungen	169
16.1.3	Untersuchung zum Einfluss des Spacers auf die Abspaltung.....	169
16.2	Abspaltung von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu.....	170
16.3	Abspaltung von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu	171
16.4	Abspaltung von Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (Hexapeptid)	173
16.5	Abspaltung von Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (Undecapeptid).....	175
16.5.1	Abspaltung des direkt an die Festphase gekuppelten Undecapeptids	175
16.5.2	Abspaltung des an der Festphase aufgebauten Undecapeptids.....	176
17	Cyclisierung und Abspaltung der Undecapeptide	178
17.1	Optimierung der Abspaltungs- und Cyclisierungsbedingungen .	178
17.2	Cyclisierung und Abspaltung an der Festphase aufgebauter Undecapeptide	181
18	Synthese der Referenzverbindungen	183
19	Quantifizierungen	191

19.1	Bestimmung der Ausbeuten anhand von relativen Flächenfaktoren	
	191
20	Literaturverzeichnis	192

Liste der verwendeten Abkürzungen

A	Absorption (UV/VIS)
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abu	α -Aminobuttersäure
Ac	Acetyl
AG	Agrogel (Harz)
Ala	Alanin
APT	<i>attached proton test</i> (NMR)
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
BBV	Beladungsbestimmungsvorschrift
BEP	2-Brom-1-ethyl-pyridinium tetrafluoroborat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
BTEAC	Benzyltriethylammoniumchlorid
Bzl	Benzyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> (NMR)
Cs	Cyclosporin
δ	chemische Verschiebung (NMR)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> (NMR)
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	N-Ethyldiisopropylamin (Hünigs Base)
DMA	N,N-Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy[1.3.5]triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid
DPPA	Diphenylphosphoryl azid
DVB	Divinylbenzol (Harz)
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient in $[\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}]$ (UV/VIS)
EE	Essigsäureethylester
eq.	Equivalent/e
ESI	Elektrosprayionisation (MS)
Et	Ethyl
FEP	2-Fluor-1-ethyl-pyridinium tetrafluoroborat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde/n
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMBA	4-Hydroxymethyl-benzoic acid (Linker)
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i> (NMR)
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum correlation</i> (NMR)
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HOObt	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum
IL	Interleukin
J	Kopplungskonstante in [Hz] (NMR)
Leu	Leucin
LM	Lösungsmittel
m/z	Masse pro Ladung
Me	Methyl
MeBmt	(4R)-4-((E)-2-Butenyl)-4,N-dimethyl-L-threonin

MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute/n
mL	Milliliter
MS	Massenspektrum/-spektroskopie
MTBD	7-Methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en
NF-AT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz
NOESY	<i>nuclear overhauser and exchange spectroscopy</i> (NMR)
<i>o</i> -Nbs-Cl	<i>ortho</i> -Nitrobenzolsulfonylchlorid
PAM	Phenylacetamidomethyl (Linker)
PDA	Photo Dioden Array (Detektor, HPLC)
PEG	Polyethylenglykol (Harz)
Ph	Phenyl
PITC	Phenylisothiocyanat
ppm	<i>parts per million</i>
Pro	Prolin
PS	Polystyrol (Harz)
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
PyBroP	Brom- tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
quant.	quantitativ
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RT	Raumtemperatur
SAB	Struktur-Aktivitätsbeziehung
Sar	Sarcosin
Ser	Serin
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
Su	Succinimid

TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFFH	N,N,N',N'-Tetramethyl-fluoroformamidinium hexafluorophosphat
TG	Tentagel (Harz)
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran (Linker)
Thr	Threonin
TsOH	Toluolsulfonsäure
UV/VIS	Ultraviolett/Visible-Spektrum/-Spektroskopie
Val	Valin
Z	Benzyloxycarbonyl

Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Cyclosporin

1.1.1 Einführung

Mikroorganismen sind der Ursprung einer grossen Vielfalt von cyclischen Peptiden und Depsipeptiden. Viele dieser Peptide beinhalten nicht-proteinogene Aminosäuren oder chemisch modifizierte Arten proteinogener Vorläufer, wie zum Beispiel N-methylierte Aminosäuren, Dehydroaminosäuren oder heterocyclische Strukturen gebildet durch Cyclisierung von Peptiden, die Serin, Threonin oder Cystein beinhalten.

Viele dieser Verbindungen wurden aufgrund ihrer bemerkenswerten biologischen Eigenschaften entdeckt (*Abbildung 1, Tabelle 1*).¹

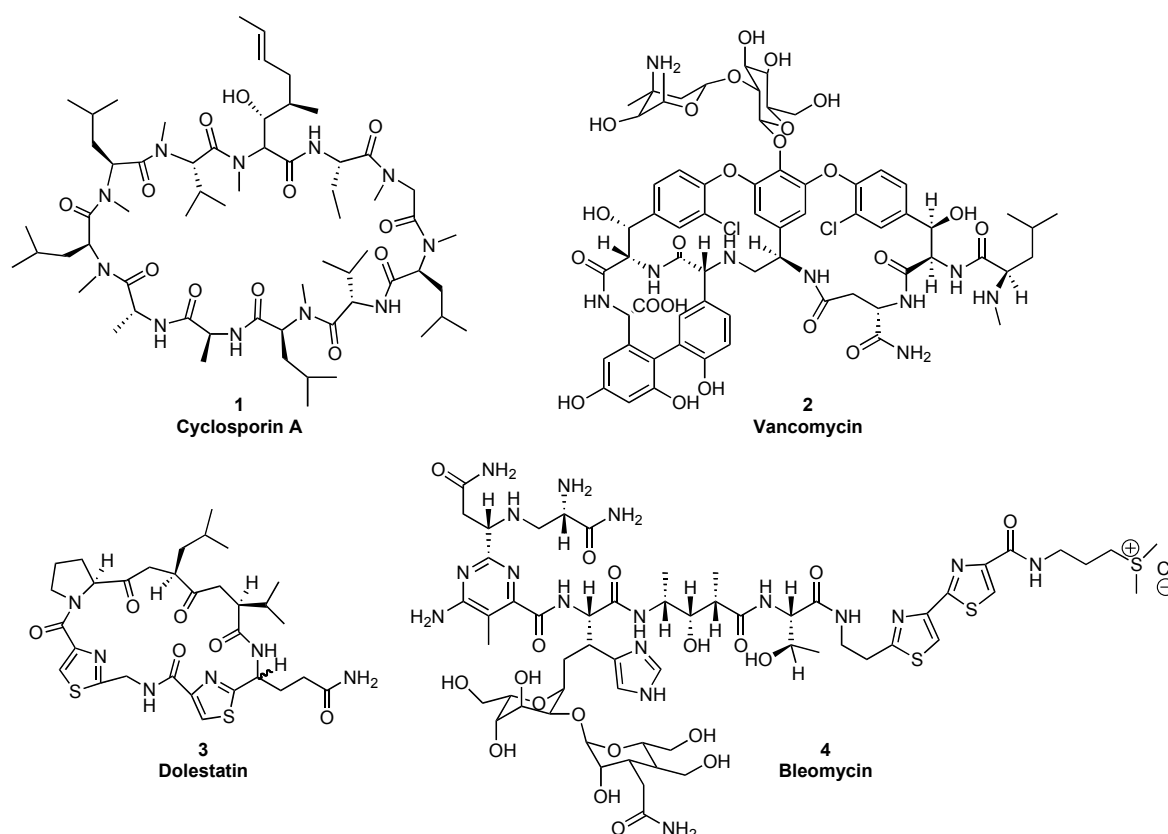


Abbildung 1 *Strukturen der Peptide 1-4*

Verbindung	Nr.	Microorganismus	Wirkung
Cyclosporin A	1	<i>Tolypocladium inflatum</i> GAMS	immunosuppressiv
Vancomycin	2	<i>Streptomyces orientalis</i>	antibakteriell
Dolastatin	3	<i>Dollabella auricularia</i>	zellwachstumshemmend
Bleomycin	4	<i>Streptomyces verticillus</i>	antineoplastisch

Tabelle 1 Beispiele biologisch aktiver Peptide

Mikroorganismen, die 1969 aus Bodenproben aus Norwegen isoliert wurden, produzierten eine Mischung von Metaboliten mit antimykotischen Eigenschaften. Später wurden diese Mikroorganismen als *Tolypocladium inflatum* GAMS und *Cylindrocarpon lucidum* BOOTH (fungi imperfecti) identifiziert (Abbildung 2).

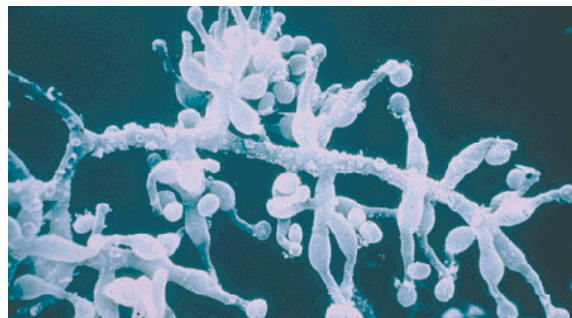


Abbildung 2 *Tolypocladium inflatum* GAMS

Aufgrund der antimykotischen Wirkung wurde die aus der Metabolitenmischung isolierte Hauptkomponente Cyclosporin A (CsA) weiteren pharmakologischen Tests unterzogen. Vorerst zeigte sich eine immunsuppressive und eine stark entzündungshemmende Wirkung; erst später wurde die Wirksamkeit gegen Malaria und HIV entdeckt.²⁻⁸

Zur gleichen Zeit kämpfte die aufkommende Transplantationsmedizin mit dem Problem der Abstossung des Fremdgewebes bereits kurze Zeit nach der Operation durch eine sehr starke Immunabwehrreaktion des Körpers. Die Entdeckung von CsA verschaffte der Transplantationsmedizin den Durchbruch. Die letzte Hürde auf dem Weg zum klinischen Wirkstoff stellte dabei die Übertragung der an Hunden, Ratten und Affen gewonnenen Resultate auf den Menschen dar. Niemand wusste genau,

wieviel CsA man in welcher Form verabreichen musste, um die Immunabwehrreaktion des Körpers zu schwächen. Wurde die nicht-wasserlösliche Substanz geschluckt oder unter die Haut gespritzt, ging praktisch nichts in die Blutbahn über, das Medikament wurde ausgeschieden und verfehlte seine antizipierte Wirkung. So starben 1978 die meisten Patienten, denen eine neue Niere verpflanzt wurde, an schwerer Nierenvergiftung durch eine Überdosis Cyclosporin. Nach und nach wurde die Dosis reduziert, und die eigentliche Wirkung des Suppressionseffektes stellte sich ein.

1982 wurde der Wirkstoff unter dem Namen Sandimmun[®] für Transplantationen zugelassen. Der kommerzielle Erfolg nahm seinen Anfang. In der später entwickelten Formulierung Neoral[®] wurde die Wirksamkeit des ursprünglichen Medikamentes verbessert und der Zeitraum für die Stabilisierung der Blutwerte im Anschluss an eine Transplantation verkürzt.

Noch heute gehört Sandimmun[®]/Neoral[®] (0.92 Mrd.) nach Diovan[®] (Bluthochdruck, 4.23 Mrd.), Glivec[®] (Leukämie, 2.55 Mrd.), Lotrel (Bluthochdruck, 1.35 Mrd.), Zoneta (Komplikationen bei Krebs, 1.28 Mrd.) und Lamisil (Pilzinfektionen, 0.98 Mrd.) zu den sechs umsatzstärksten Medikamenten der Firma Novartis.⁹

1.1.2 Struktur

Cyclosporin A (CsA, **1**) ist ein cyclisches Undecapeptid, das mit einer Ausnahme aus aliphatischen Aminosäuren besteht. Sieben N-methylierte Aminosäuren verleihen dem neutralen Molekül sehr apolare Eigenschaften. Die übrigen vier nicht N-methylierten Aminosäuren bilden intramolekulare Wasserstoffbrücken mit Carboxylgruppen aus. Dadurch ist CsA in Wasser unlöslich, besitzt jedoch in organischen Lösungsmitteln eine gute Löslichkeit.

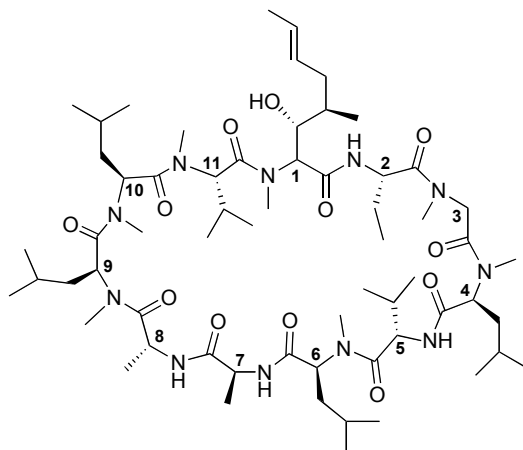


Abbildung 3 Cyclosporin A (**1**)

CsA besitzt drei unnatürliche Strukturelemente: L- α -Aminobuttersäure (Abu², **5**), D-Alanin (D-Ala⁸, **6**) und die bis zur Entdeckung des Metaboliten unbekannte C₉-Aminosäure MeBmt¹ ((4*R*)-4-((*E*)-2-butenyl)-4,N-dimethyl-L-threonin, **7**).

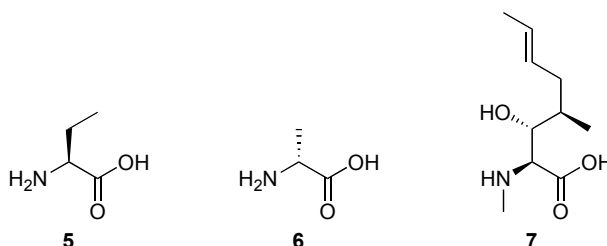


Abbildung 4 Abu (**5**), D-Ala (**6**), MeBmt (**7**)

Neben CsA konnten in der Folge aus den Fermentationsprozessen zur Herstellung von CsA eine Reihe von weiteren Nebenmetaboliten isoliert werden.^{3, 10, 11} Diese weisen strukturell und zum Teil auch in ihrer Wirkungsweise eine nahe Verwandtschaft zur A-Komponente von Cs auf (*Tabelle 2*). In Analogie zum Hauptmetaboliten werden sie als Cyclosporine B-Z (CsB-Z) bezeichnet. Die Strukturaufklärung dieser Nebenmetaboliten erfolgte durch Bestimmung der Aminosäuresequenz, durch Auswertung spektroskopischer Daten (NMR) und durch Röntgen-Kristallanalyse.

Metabolit	Aminosäure										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CsA	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsB	MeBmt	Ala	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsC	MeBmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsD	MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsE	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
CsF	Desoxy-MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsG	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsH	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	D-MeVal
CsI	MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CsK	Desoxy-MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsL	Bmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsM	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Nva	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsN	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CsO	MeLeu	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsP	Bmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsQ	MeBmt	Abu	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsR	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CsS	MeBmt	Thr	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsT	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
CsU	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsV	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Abu	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsW	MeBmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
CsX	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal
CsY	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
CsZ	Meaminooctansre	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal

Tabelle 2 *Strukturen der Cyclosporine A-Z*

1.1.3 Konformationen von Cyclosporin A

Die Flexibilität von Cyclosporin A in Lösung ist gering, wodurch sich meist eine Hauptkonformation ausbildet. Im kristallinen Zustand kann das Peptid in zwei strukturell unterschiedliche Regionen unterteilt werden (*Abbildung 5*):

- a)** Ein β -Fragment bestehend aus den Aminosäuren 11-7, die ein antiparalleles β -Faltblatt mit einem Typ II β -Turn der Aminosäuren 2-5 ausbilden. Drei Wasserstoffbrücken verbinden die zwei kurzen β -Stränge und erhöhen die Stabilität des Fragmentes.
- b)** Die Reste 7-11 bilden ein zweites Fragment, den Loop. Dieser beinhaltet die vierte Wasserstoffbrücke zwischen N^8 und O^6 , D-Alanin in Position 8 und die einzige cis-Amid Bindung zwischen den Aminosäuren 9 und 10.

Die Seitenkette von MeBmt¹ ist in das β -Faltblatt verdreht.

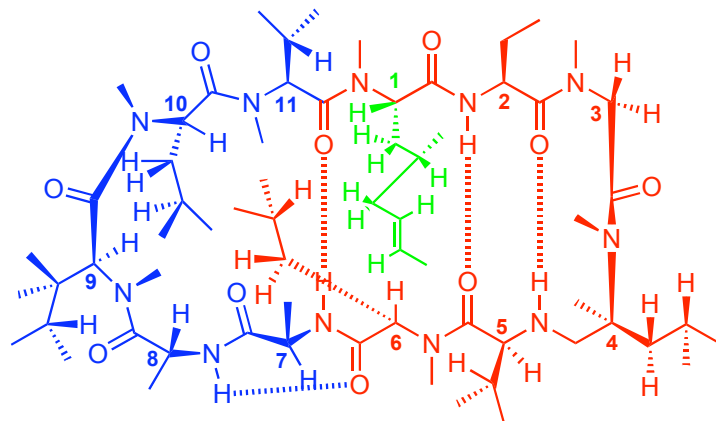


Abbildung 5 Kristallstruktur von CsA

Die Konformation von CsA in apolaren Lösungsmitteln stimmt mit der im Kristall gefundenen Konformation weitestgehend überein.^{12, 13} Gebunden an den Rezeptor Cyclophilin (*Kapitel 1.1.5*) wird das Peptidrückgrat nach aussen verdreht, wobei alle sekundären Strukturelemente verloren gehen.¹⁴⁻¹⁶ Ist CsA an einen monoklonalen Antikörper gebunden, liegt eine dritte Konformation vor (*Abbildung 6*).^{12-14, 17, 18}

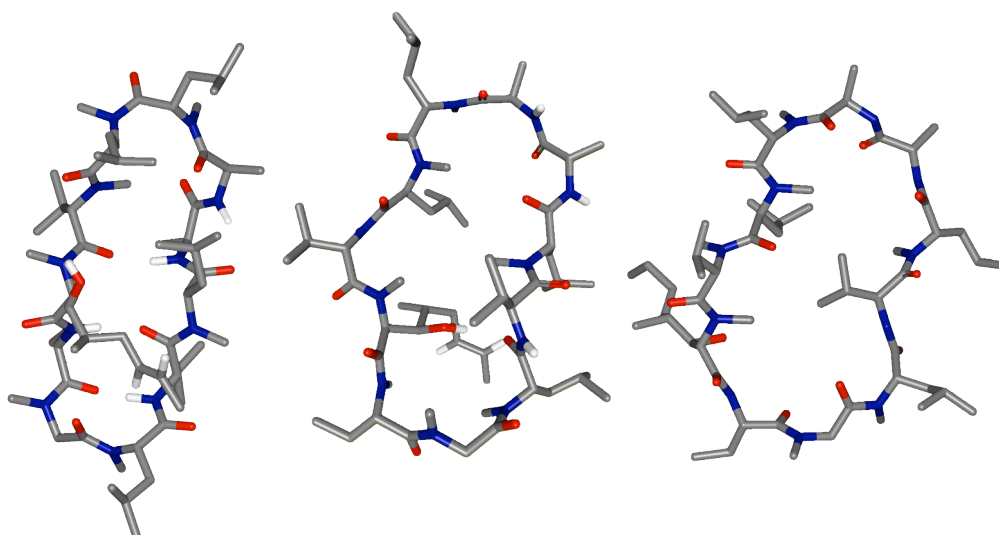


Abbildung 6 Konformationen von CsA im Kristall (links), gebunden an den Rezeptor Cyclophilin (Mitte) und gebunden an einen monoklonalen Antikörper (rechts)

1.1.4 Synthese von Cyclosporin A

1.1.4.1 Biosynthese

Das Auftreten zahlreicher Nebenmetabolite und die ungewöhnlichen Strukturelemente L- α -Aminobuttersäure, D-Alanin und die C₉-Aminosäure (MeBmt) liessen früh darauf schliessen, dass die Biosynthese von CsA durch einen multifunktionalen Enzymkomplex erfolgt.^{19, 20} Einbauversuche mit radioaktiv markierten Acetat- und Methionin-Einheiten zeigten, dass die charakteristische C₉-Aminosäure durch Kondensation von vier Acetat-Einheiten gebildet wird, während sowohl ihre C-Methylgruppe als auch die N-Methylgruppen der Aminosäuren aus Methionin stammen.²¹ Der Verlauf der Biosynthese konnte durch Zugabe von Vorläufern markant beeinflusst werden. In Position 2 wurden sehr leicht Modifikationen eingebaut und führten zu einer Erhöhung der Ausbeuten der entsprechenden Cyclosporinderivate. Die gezielte Biosynthese lieferte wertvolle Erkenntnisse für die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Cyclosporin-Reihe.

Die Cyclosporin-Synthetase ist ein Multienzym-Polypeptid mit einer Molekülmasse von ~ 1.4 MDa.^{22, 23} Sie stellt eine der komplexesten Peptidsynthetasen dar, die bisher entdeckt wurde. Der Enzymkomplex katalysiert in einem fließbandähnlichen Mechanismus mindestens 40 Reaktionsschritte. Er aktiviert Aminosäurebestandteile der Cyclosporinsynthese als Thioester und führt spezifische N-Methylierungen der

Aminosäuren aus. Während der Synthese werden die aktivierten Aminosäuren-Einheiten durch Peptidbindungen verbunden, was zu einer enzymgebundenen, linearen Peptidkette führt. Einige dieser linearen Zwischenprodukte konnten isoliert und deren N-terminale Aminosäuren bestimmt werden. D-Alanin scheint dabei eine Schlüsselposition als „Start-Aminosäure“ einzunehmen. Alle isolierten Peptide lieferten Sequenzen von CsA mit D-Alanin⁸. Dies unterstreicht die Wahrscheinlichkeit, dass die lineare Peptidkette des CsA durch einen stufenweisen Aufbau erzeugt wird.²⁴ Noch heute wird CsA durch Fermentationsprozesse gewonnen, da eine Totalsynthese viel zu aufwendig und zu teuer wäre.

1.1.4.2 Totalsynthese

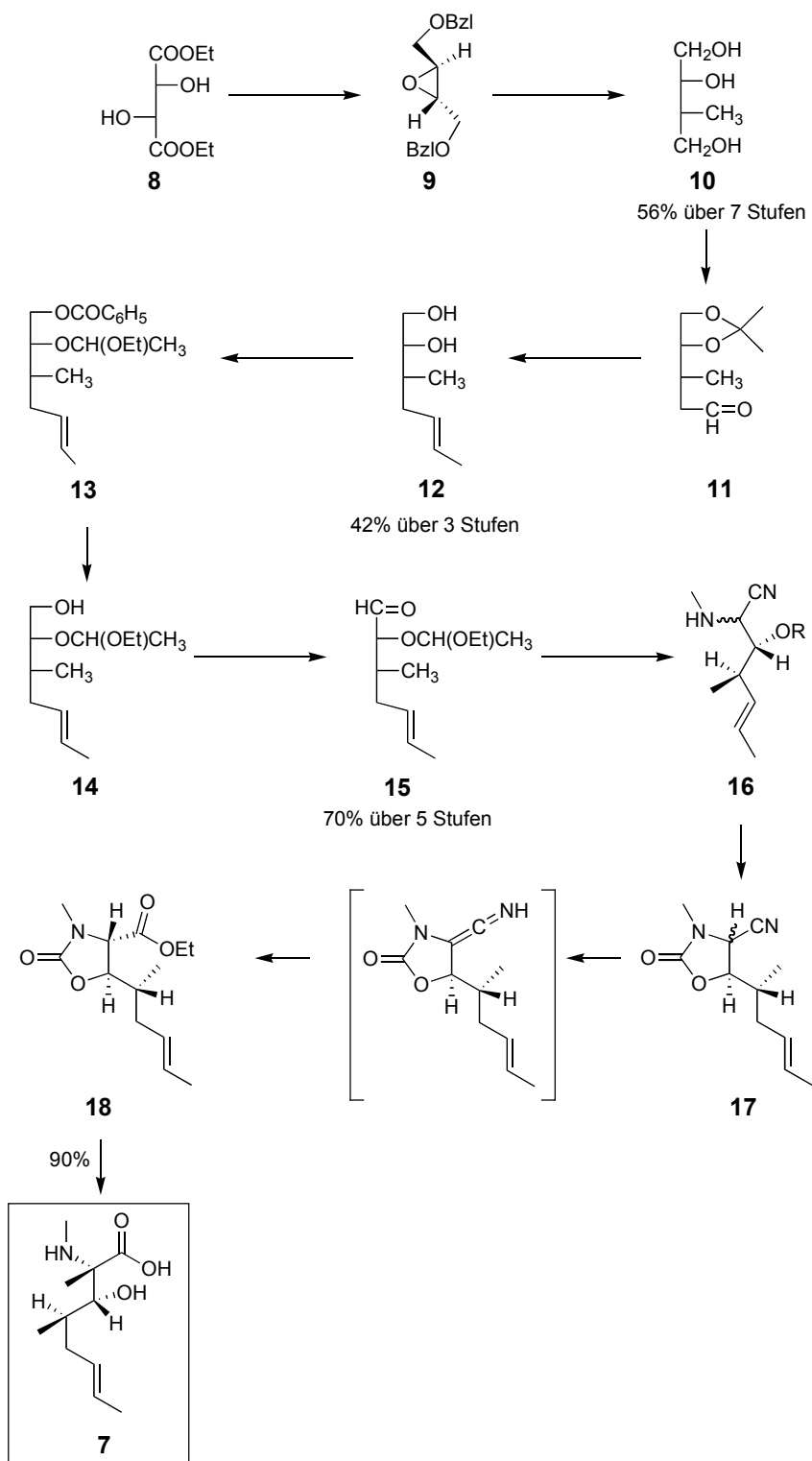
Für ein besseres Verständnis der Struktur-Aktivitätsbeziehung der Cyclosporin-Familie mussten Derivate synthetisch hergestellt werden, die nicht durch Biosynthese beziehungsweise modifizierte Fermentationsprozesse erhalten werden konnten.^{25, 26}

Die erste Totalsynthese von CsA wurde von Wenger entwickelt und kann in drei wichtige Prozesse unterteilt werden:

a) das klassische Problem der Bildung des Makrocyclus, b) die stereospezifische Synthese von MeBmt und c) die Kupplung von N-methylierten Aminosäuren ohne Racemisierung.²⁷

1.1.4.2.1 *Synthese von MeBmt*

Die Aminosäure wurde durch Wenger erstmals 1983 synthetisiert und ist in *Schema 1* dargestellt.²⁸



Schema 1 *Synthese von MeBmt (7)*

Ausgehend von (*R,R*)-(+)-Weinsäure (**8**) wird durch eine erste Reaktionssequenz das optisch aktive Triol **10** erhalten. Den entscheidenden Schritt bildet dabei die Einführung der Methylgruppe unter Umkehr der Konfiguration des (*S,S*)-Epoxids **9** mit Methyllithiumcuprat. Bedingt durch die C₂-Symmetrie von **9** erhält man Triol **10**, als einziges Produkt mit einer Ausbeute von 56% über 7 Stufen.

Die ungesättigte C₃-Einheit (mit der *trans*-Doppelbindung) kann durch selektiven Schutz der vicinalen Hydroxyfunktionen in **10**, sowie Oxidation der dritten in eine Aldehydfunktion und anschliessender Wittigreaktion mit **11** eingebaut werden. Die folgende Entschützung führt zum olefinischen Diol **12** (42%, 3 Stufen). Die direkte Umwandlung von **12** in den Hydroxyaldehyd **15** durch Pfitzner-Moffat-Oxidation gelingt nur in tiefen Ausbeuten. Erst nach selektivem Schutz der sekundären Hydroxygruppe über **13** und **14** werden befriedigende Ausbeuten erhalten (70%, 5 Stufen).

Die abschliessende Streckersynthese wird mit dem ungeschützten Aldehyd durchgeführt. Man erhält nach der Reaktion von **16** mit CDI das entsprechende Diastereomerengemisch des Methylaminonitrils **17**. Dieses kann mit Ethanol/Kaliumcarbonat selektiv in das *trans*-Oxazolidinon **18** überführt werden. Der letzte Schritt, die Hydrolyse unter sauren und anschliessend basischen Bedingungen liefert das enantiomerenreine MeBmt (**7**) in 90%iger Ausbeute.

Weitere stereospezifische Synthesen von MeBmt wurden von Evans²⁹, Seebach³⁰, Rich^{31, 32} und Schmidt³³ publiziert.

1.1.4.2.2 Synthese von CsA

Die erste Totalsynthese von CsA wurde von Wenger entwickelt.^{27, 34, 35} Andere Gruppen folgten und synthetisierten Derivate mit Modifikationen gewisser Aminosäuren in der CsA Peptidkette. Im folgenden wird auf die erste Synthese von Wenger näher eingegangen.

Aus folgenden Gründen wurde bei diesem Syntheseweg die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 7 (Ala) und 8 (D-Ala) gewählt, um im letzten Schritt das cyclische Endprodukt zu bilden:

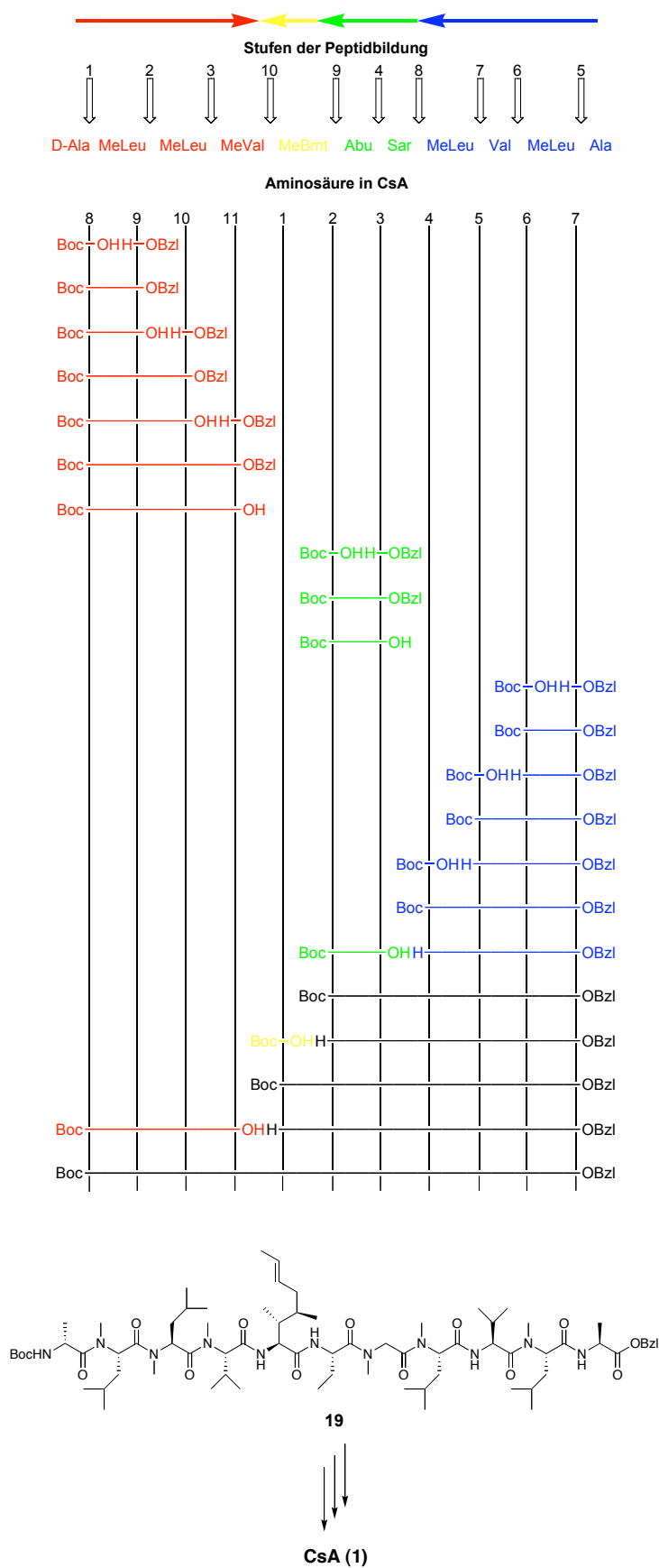
1. Die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen zwei N-methylierten Aminosäuren erfolgt schwieriger als bei nicht N-methylierten Derivaten.

2. Wasserstoffbrücken stabilisieren das lineare Peptid in der gewünschten Lage und bilden eine Präkonformation aus, was einen einfacheren Ringschluss ermöglicht.
3. Die beim Ringschluss involvierte D-Aminosäure sollte einen einfacheren Ringschluss ermöglichen.

Die Herstellung des linearen Undecapeptids erfolgte über Kondensationen von vorgefertigten Fragmenten. Dies ermöglichte einen späten Einbau, und eine damit verbundene, geringere Anzahl an Reaktionsschritten mit der C₉-Aminosäure MeBmt (**7**). Die Peptidfragmente wurden durch stufenweisen Aufbau aus den in CsA vorhandenen Aminosäuren hergestellt (*Schema 2*).

Als Schutzgruppen wurden t-Butoxycarbonyl (Boc) für die Aminogruppen beziehungsweise Benzylester (Bzl) für die Säuregruppen der Aminosäuren gewählt.

Die Aktivierung der Carboxylfunktionen vor der Peptidknüpfung von N-methylierten Aminosäuren stellte bei der Herstellung von CsA ein grosses Problem dar. Die Zunahme der sterischen Hinderung und die damit verbundene Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit resultierte in einer starken Vergrösserung der Epimerisierungstendenz.^{36, 37} Die gleichzeitig erhöhte Acidität des α -Wasserstoffatoms bei N-methylierten Aminosäuren vereinfacht die Racemisierung zusätzlich. Deshalb mussten genau kontrollierte Reaktionswege gefunden werden, um die Racemisierung/Epimerisierung während den Peptidkupplungen zu minimieren.



Schema 2

Synthese von Cyclosporin A in Lösung

Wenger modifizierte für die Aktivierung der Carboxylgruppen eine Methode von Zaoral über ein gemischtes Anhydrid.³⁸ Um die Methode an die Kupplungsanforderungen von N-methylierten Aminosäuren anzupassen, bildete er das gemischte Anhydrid mit Pivaloylchlorid bei -20°C unter Zugabe von 2 Äquivalenten einer tertiären Base (N-Methylmorpholin). Die anschließende Peptidbildung wurde ebenfalls bei -20°C durchgeführt, um die Epimerisierung der aktivierten Carboxylgruppe via Enolisierung zu unterdrücken.

Das Tetrapeptid 8-11 wurde in Richtung des C-Terminus aufgebaut, da ein umgekehrter Aufbau, bedingt durch spontane Diketopiperazinbildung auf der Stufe H-MeLeu¹⁰-MeVal¹¹-OBzl, nicht möglich war. Später zeigte sich, dass im Gegensatz dazu ein durch t-Butylester geschütztes Derivat keine Tendenz zur Diketopiperazinbildung aufwies.³⁶ Die Fragmente 4-7 und 2-3 wurden auf dem klassischen Kupplungsweg Richtung N-Terminus synthetisiert. Die Peptidkupplungen ohne aufeinanderfolgende N-Methyl Aminosäuresequenzen zeigten hohe Ausbeuten. Die nun folgende Knüpfung des Fragmentes 2-7 lieferte in 88% Ausbeute das Hexapeptid, welches anschliessend durch MeBmt¹ mit DCCI/HOBt verlängert wurde. Die Kupplung der Bausteine 1-7 und 8-11 zum geschützten Undecapeptid **19** gelang mit BOP.³⁹ Der Ester wurde unter basischen Bedingungen verseift, und die Boc-Schutzgruppe mit TFA gespalten. Die Cyclisierung des entschützten Undecapeptids, stark verdünnt (0.0002 M) in Methylenchlorid, wurde mit BOP unter Zusatz von N-Methylmorpholin durchgeführt. Man erhielt das gewünschte CsA (**1**) in 62% Ausbeute. Andere Cyclisierungsversuche von Wiesmann/Kleiner⁴⁰ oder Kovacs⁴¹ führten zu ähnlichen Ausbeuten und Resultaten.

1.1.5 Wirkungsweise von CsA

Cyclosporin A gilt als das älteste spezifische T-Zell-Immunsuppressivum, das heisst, der Wirkstoff hemmt gezielt die Abwehrreaktion der Immunzellen. Durch den sehr speziellen Wirkmechanismus werden die übrigen Immunzellen nicht im selben Umfang beeinflusst, so dass das Immunsystem beim Grossteil seiner eigentlichen biologischen Aufgaben (zum Beispiel Abwehr von Infektionen) nicht so stark wie bei vielen anderen Immunsuppressiva beeinträchtigt wird.

1.1.5.1 Immunsuppression

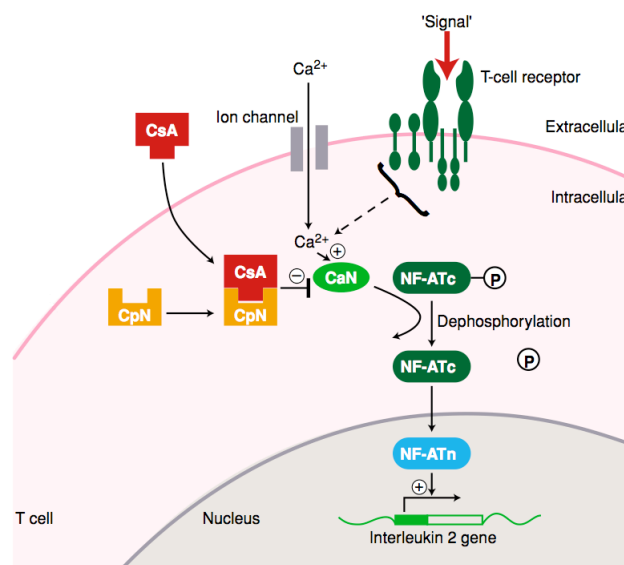
Immunsuppression ist das Bremsen oder Stilllegen von Teilen des Abwehrsystems des Körpers. Wichtige Bestandteile des Immunsystems sind die T-Lymphozyten, eine spezielle Gruppe der weissen Blutkörperchen. Diese zerstören in der Blutbahn und im Lymphsystem alle Körperzellen die gefährlich sein könnten (zum Beispiel von Viren befallene Zellen oder Krebszellen). Es werden aber auch gesunde, von anderen Menschen stammende Zellen durch die T-Zellen als fremd erkannt und zerstört.

Es sind daher vor allem diese T-Lymphozyten, die eine Zerstörung von transplantierten Organen veranlassen können.

Eine wichtige Rolle während des Auslösungsprozesses der Immunantwort kommt den Zytokinen zu. Diese chemischen Botenstoffe werden im Körper gebildet und koordinieren die verschiedenen Zellen, die in den Prozess der Immunantwort involviert sind. Innerhalb der Zytokine spielt wiederum Interleukin 2 (IL-2) eine wichtige Rolle, da es das Wachstum und die Differenzierung der T-Zellen stimuliert.

1.1.5.2 Wirkungsweise von Calcineurininhibitoren

Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A hemmen die Produktion von Botenstoffen (Zytokinen), die ruhende T-Zellen in aktive, das Transplantat angreifende T-Killerzellen verwandeln. Im Fall von Cyclosporin A verläuft der Eingriff in die Aktivierung der T-Zellen nach dem im *Schema 3* dargestellten Mechanismus ab.



Schema 3 *Wirkungsweise von CsA*

Die Erkennung eines Antigens durch den T-Zellen-Rezeptor führt in der T-Zelle zu einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration. Das analog zum Cyclophilin ubiquitär vorkommende Molekül Calmodulin wird durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen aktiviert und stimuliert hierdurch schliesslich die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin. Das aktivierte Calcineurin spaltet zwei Phosphatgruppen von den nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen (NF-AT) ab, wodurch diese in den Zellkern wandern und den Transkriptionsprozess von Interleukin-2 (IL-2) auslösen können.

CsA greift in die frühe Phase der T-Zell-Aktivierung ein. Nach dem Eintritt in die T-Zellen wird CsA in sehr hoher Affinität an Cyclophilin gebunden. Wie bereits in *Kapitel 1.1.3* beschrieben, findet durch die Bindung an Cyclophilin eine Konformationsänderung statt, die erst die Bindung eines weiteren Proteins (Calcineurin) ermöglicht, welches als Phosphatase wie oben beschrieben einen direkten Einfluss auf die Signalkaskade im Zytosol ausübt. Durch die Ausbildung des Cyclophilin/Cyclosporin/Calcineurin Komplexes erfolgt eine Inhibierung der nukleären Transkriptionsfaktoren (NF-AT) und dadurch eine Hemmung der Produktion von Botenstoffen (Zytokinen). In Gegenwart von CsA bleibt die Aktivierung des IL-2 Gens aus. Bei fehlendem IL-2 können die T-Lymphozyten nicht aktiviert werden und bereits aktivierte Zellen können sich nicht vermehren, was zu einer reversiblen Hemmung des Immunsystems führt. Das Ergebnis ist eine hochselektive immunsuppressive Wirkung.^{15, 42-45}

1.1.5.3 Nebenwirkungen von CsA

Eine immunsuppressive Therapie beeinträchtigt die natürliche Abwehrleistung des Körpers, vor allem bei der Abwehr von Viren und Krebszellen. Daher kann es während einer Immunsuppression zu schweren Infektionen mit Erregern kommen, die gesunden Menschen nichts oder nur kurzfristig etwas anhaben können. Dosisabhängig können schwere Nebenwirkungen (zum Beispiel Nephrotoxizität) auftreten. Dosisabhängig bedeutet, dass die meisten Nebenwirkungen abnehmen, wenn die Dosis des Calcineurininhibitors verringert wird.^{46, 47}

Eine immunsuppressive Therapie ist somit immer eine Gratwanderung zwischen Wirksamkeit und Toxizität.

1.1.6 Struktur-Aktivitäts-Beziehung

Die als Nebenmetaboliten gefundenen Cyclosporinanaloga (*Kapitel 1.1.2.*) lieferten die Voraussetzung zum Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAB). Der synthetische Zugang zu CsA lieferte nun neu auch die Möglichkeit, sämtliche Aminosäuren der Peptidkette des CsA zu variieren und den Einfluss der Modifikation auf die SAB zu untersuchen. Primär von Interesse waren vor allem die Modifikationen an der MeBmt¹-Einheit, an der direkten Umgebung von MeBmt¹ (Aminosäuren 2, 3 und 11), aber auch Modifikationen, die den Loop der Aminosäuren 7-11 betrafen (*Tabelle 3*).^{1, 35, 48}

Die Modifikationen zeigten, dass die C-Kette von MeBmt¹ eine entscheidende Bedeutung für die biologische Aktivität besitzt. Der Ersatz von MeBmt¹ durch MeThr **20** reduziert die immunsuppressive Aktivität drastisch analog zu Modifikationen der Hydroxygruppe von MeBmt¹ (O-Acetyl-, Desoxy-Cyclosporin (CsF) **21/22**, *Abbildung 7*). MeBmt¹ alleine reicht jedoch nicht zur Erzeugung der immunsuppressiven Wirkung aus (**23**). Die Aminosäure 2 (Abu²) erlaubt Modifikationen der Alkylseitenkette: während die Modifikation durch (Thr²)Cs (CsC, **24**) in einer starken immunsuppressiven Wirkung resultiert, kommt es durch den Austausch von Abu² durch Ser zu einer deutlich schwächeren Aktivität ((Ser²)Cs, **25**). Der Einbau von Ala (CsB, **26**) oder Valin (CsD, **27**) an der Position 2 schwächt hingegen die biologische Aktivität nur leicht ab. Obwohl (D-Pro³)Cs **28** und (MeLeu¹¹)Cs **29** sowohl im NMR als auch in der Röntgenstrukturanalyse eine sehr ähnliche Konformation wie CsA aufweisen, sind sie weniger aktiv als CsA selbst. Dies wohl aufgrund des erhöhten sterischen Anspruchs der Modifikationen, die eine effektive Bindung an den Rezeptor verunmöglichen. (L-Pro³)Cs **30** zeigt keine Aktivität, da zu dem oben genannten erhöhten sterischen Anspruch hier zusätzlich noch eine signifikante Veränderung der gesamten Konformation in einer für die Rezeptorbindung entscheidenden Region hinzu kommt.

Die Isopropylgruppe von MeVal¹¹ scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorbindung zu spielen. Ersatz durch MeAla **31**, MeLeu **30** oder MeIleu **32** führt zu einem Verlust der immunsuppressiven Aktivität.

Variationen der AS 7-11 durch Einbau von Val¹¹ **33**, Leu⁶ **34** oder D-Ala⁷ **35**, verändern den Loop (Grösse oder Zerstörung durch zusätzliche Wasserstoffbrücken)

und dadurch die Konformation derart stark, dass sämtliche Aktivität des Wirkstoffes verloren geht. Im Gegensatz dazu führen konformativ stabilisierende Elemente wie D-Ser⁸ **36**, ein bicyclisches oder sogar ein tricyclisches CsA (**37** und **38**, *Abbildung 7*) zu einer 3-4-fach erhöhten immunsuppressiven Wirkung.^{49, 50} Dabei scheint entscheidend, dass sich in diesem Fall vor allem die Bindung an Calcineurin verstärkt, und gleichzeitig die Bindungsfläche an Cyclophilin und die grundlegende Konformation nicht verändert werden.

Neue Resultate zeigen, dass durch Modifikationen einerseits zwar die immunsuppressive Wirkung verloren geht, andererseits aber gleichzeitig neue Aktivitäten, zum Beispiel anti-HIV Wirkung, geschaffen werden können.⁵¹

AS in CsA	Position	Modifikation	Cs	Substanz	Aktivität
MeBmt	1	MeThr		20	*
MeBmt	1	(3-O-Ac)-MeBmt		21	**
MeBmt	1	Desoxy-MeBmt	CsF	22	**
MeBmt	1	Einzelne AS		23	*
Abu	2	Thr	CsC	24	***
Abu	2	Ser		25	*
Abu	2	Ala	CsB	26	**
Abu	2	Val	CsD	27	**
Sar	3	D-Pro		28	*
Sar	3	L-Pro		30	*
MeLeu	6	Leu	CsU	34	*
Ala	7	D-Ala		35	*
Ala-D-Ala	7,8	TCsA		37	****
D-Ala	8	Ser		36	****
D-Ala	8	BCsA		38	****
MeVal	11	Val	CsE	33	*
MeVal	11	MeAla		31	*
MeVal	11	MeLeu		29	*
MeVal	11	MeIle		32	*

* Keine ** Schwächere *** Gleiche **** Erhöhte Aktivität im Vergleich zu CsA

Tabelle 3 Vergleich der Aktivitäten von verschiedenen Cyclosporinderivaten

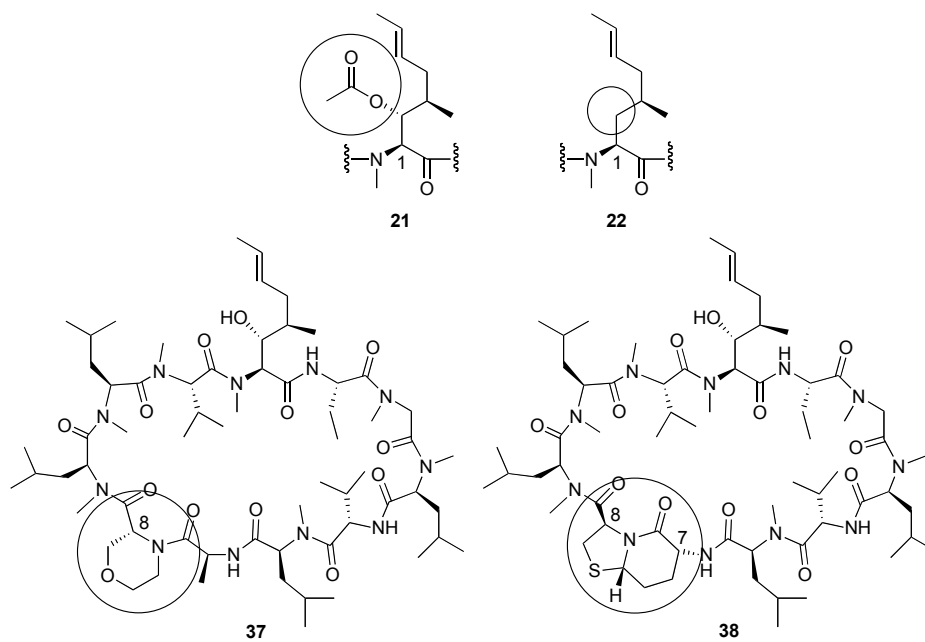


Abbildung 7 *Modifikationen in Cs mit leicht erniedrigender (21/22) und stark erhöhender Aktivität (37/38)*

1.2 Kombinatorische Chemie und Festphasensynthese

1.2.1 Einführung

Die Festphasensynthese stellt eine Methode dar, bei welcher chemische Modifikationen an einem Molekül durchgeführt werden, welches an ein unlösliches Trägermaterial, die Festphase, kovalent gebunden ist. Ursprünglich entwickelt für die Peptid- und später für die Oligonucleotidsynthese, stellt sie heute für die pharmazeutische Industrie ein wichtiges Instrument zur Herstellung von Substanzbibliotheken auf dem Weg zur Entwicklung neuer Wirkstoffe dar.⁵²⁻⁵⁴

Die kombinatorische Chemie basiert auf den Prinzipien der Natur, die durch Kombination weniger Grundbausteine wie Aminosäuren und Nukleinbasen die unermessliche Vielfalt des Lebens aufgebaut hat.

1.2.2 Kombinatorische Chemie in der Wirkstoffsuche

Die Identifizierung eines neuartigen Wirkstoffs ist noch immer ein schwieriges und aufwendiges Unterfangen, und der Bedarf an methodischen Innovationen ist daher ungebrochen. Dies gilt für Wirkstoffe verschiedenster Herkunft, z.B. Arzneimittel (für Mensch und Tier) oder Wirkstoffe in der Landwirtschaft. Allen gemeinsam ist die grundsätzliche Vorgehensweise, die sich in zwei Phasen gliedert: die *Leitstruktursuche* und die *Leitstruktureoptimierung*. In beiden Phasen spielt die kombinatorische Synthese eine wichtige Rolle und stellt ein wichtiges Werkzeug im Methodenarsenal des Wirkstoffchemikers dar. Durch systematische Molekülvariation führt sie zu einer Vielzahl von verschiedenartigen Verbindungen, die die Erfolgswahrscheinlichkeit des Wirkstoffscreenings erhöhen.⁵⁵⁻⁵⁸

Nehmen wir als Beispiel die Arzneimittelsuche: Ausgangspunkte sind Krankheiten, die man heilen oder Krankheitsbilder, die man therapeutisch verbessern will. Am Anfang des komplexen und langwierigen Entwicklungsprozesses vom Wirkstoff zum käuflichen Arzneimittel wird in einem multidisziplinären Ansatz (*Abbildung 8*) versucht, die Schlüsselmechanismen, die dem jeweiligen Krankheitsbild zugrunde liegen, aufzuspüren. Es müssen Tests entwickelt werden, mit denen eine gezielte Auswahl von biologisch aktiven Verbindungen möglich ist. Die zwei Teilbereiche

(*Leitstruktursuche* und *Leitstrukturoptimierung*) stellen unterschiedliche Anforderungen sowohl an die Testsysteme, als auch an die Screeningsubstanzen.

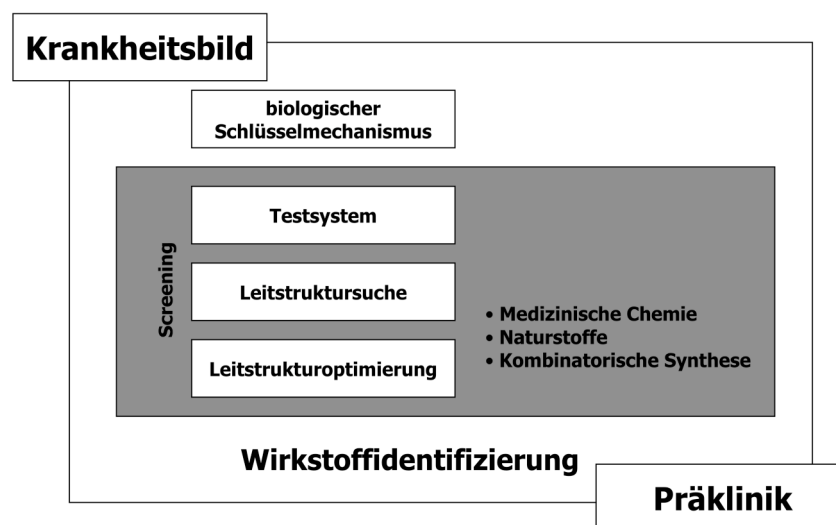


Abbildung 8 Multidisziplinärer Ansatz der Wirkstoffforschung

Zur *Leitstruktursuche* werden in einem durchsatzstarken In-vitro-Primärtest, der einen therapeutischen Schlüsselmechanismus bestmöglich beschreibt, möglichst viele verschiedenartige Substanzen zugeführt. Dies können synthetische Verbindungen und Naturstoffe unterschiedlichster Herkunft sein. In Wochen können 100'000 und mehr Substanzen auf ihre biologische Wirkung geprüft werden. Die Trefferrate ist unterschiedlich, normalerweise jedoch deutlich unter 1%. Diese Primärbefunde werden evaluiert, das heisst nach chemischen und biologischen Kriterien, wie Synthesaufwand beziehungsweise Spezifität der Wirkung oder Bioverfügbarkeit, auf ihre Eignung als mögliche Leitstrukturen untersucht. Dieser aufwendige Prozess reduziert die Anzahl der vielversprechenden Kandidaten erneut drastisch, so dass im Normalfall nur einige wenige Leitstrukturen der eigentlichen Optimierung zugeführt werden. Das Geheimnis zum Erfolg liegt daher nicht nur in der Quantität der untersuchten Verbindungen, sondern auch in ihrer Qualität, die sich in der strukturellen Diversität und der Verschiedenheit der Verbindungen äussert. Entscheidend ist nicht die Zahl der funktionellen Gruppen, Asymmetriezentren oder ausgefallenen cyclischen Systeme, sondern ihre Wirkung auf den Pharmakophor, den Teil des Moleküls, der mit dem Zielprotein in Wechselwirkung tritt und die biologische Antwort auslöst. Auf den ersten Blick „kleine“ Veränderungen an der Struktur

(Substitutionsmuster, Ladungsverteilung) können grosse Effekte auf die biologische Wirkung haben.

Im Stadium der *Leitstrukturoptimierung* wird gefordert, möglichst effizient eine bereits identifizierte Leitstruktur zu modifizieren, um eine Steigerung der Wirkungsspezifität zu erreichen. Durch systematische Variation des strukturellen Umfelds gelangt man über die Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu Kandidaten, die dann einer ausführlichen klinischen und toxikologischen Prüfung unterzogen werden.

Es existieren viele Kriterien um einen Strukturpool für das Primärscreening zusammenzustellen. Um die Trefferwahrscheinlichkeit zu erhöhen, besteht eine Möglichkeit darin, die Anzahl der zu testenden Substanzen zu vervielfachen. Dieses quantitative Ziel muss zudem in kurzer Zeit erreicht werden, um auch mit der Durchsatzgeschwindigkeit moderner Testsysteme Schritt halten zu können. Eine leistungsstarke Methode zur Darstellung von Testsubstanzen ist die kombinatorische Synthese. Sie erlaubt systematische Molekülvariationen, indem sie Reagenzien und Syntesebausteine wiederholt nutzt, aber jeweils verschieden verknüpft.

1.2.3 Kombinatorische Ansätze in der Festphasenchemie

Das Ziel der kombinatorischen Synthese ist die simultane Darstellung vieler verschiedener Produkte definierter Struktur. Die Absicht ist nicht länger die Synthese einer einzigen ausgewählten Struktur, sondern Wege zu suchen um in einem einzigen „Durchgang“ viele verschiedene Strukturen herzustellen.

Die Natur hat uns am Beispiel der Aminosäuren gezeigt, wie aus wenigen unterschiedlichen Einheiten eine riesige Anzahl von Produkten (die Peptide) mit unterschiedlichster Funktion erzeugt werden können.⁵⁶

Die kombinatorische Synthese kann dabei sowohl in flüssiger als auch an fester Phase durchgeführt werden (*Tabelle 4*).

Kombinatorische Synthese	
Festphase	Flüssige Phase
Vorteile	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Reagenzien können im Überschuss ohne Reinigungsaufwand eingesetzt werden. Die Reaktion wird so zu hohem Umsatz getrieben. ➤ Reinigung des Produktes kann durch einfache Filtration des Polymers erfolgen. ➤ Die Arbeitsvorgänge können komplett automatisiert werden. ➤ Durch split-and-mix Techniken können in kürzester Zeit grosse Verbindungsbibliotheken erstellt werden. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Grundsätzlich alle organischen Reaktionen können angewandt werden. ➤ Eine Anpassung bekannter Reaktionsbedingungen ist nicht notwendig. ➤ Eine unbegrenzte Anzahl von Produkten kann synthetisiert werden. ➤ Zusätzliche Reaktionsschritte für die Verknüpfung und Abspaltung von der Festphase sind nicht notwendig.
Nachteile	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Zusätzliche Reaktionsschritte für die Verknüpfung und Abspaltung von der Festphase sind notwendig. ➤ Festphase und Linker können die Chemie limitieren. ➤ Anpassung der Reaktionsbedingungen an die Festphase ist notwendig. ➤ Die analytischen Möglichkeiten sind noch immer sehr beschränkt. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Reagenzien können nicht ohne zusätzlichen Reinigungsaufwand im Überschuss eingesetzt werden. ➤ Automatisierung der Isolierung sowie der Reinigung ist schwierig.

Tabelle 4 Vergleich der kombinatorischen Synthese an der Festphase und in Lösung

Zwar wird nach kombinatorischen Prinzipien sowohl in homogener als auch an fester Phase gearbeitet, jedoch zeichnete sich gegen Ende des letzten Jahrzehnts ein immer grösseres Interesse an der Festphasenchemie ab. Die Festphasensynthese ist eine Methode bei der während der Synthese einer der Reaktanden an einem unlöslichen Material (Festphase) immobilisiert wird.

Ursprünglich entwickelt für die Peptidsynthese, und später für die Oligonukleotidsynthese, wird sie heutzutage, auch wegen der Auswirkungen der kombinatorischen Chemie und der gestiegenen Nachfrage nach Molekülbibliotheken, generell auch in der organischen Chemie eingesetzt.

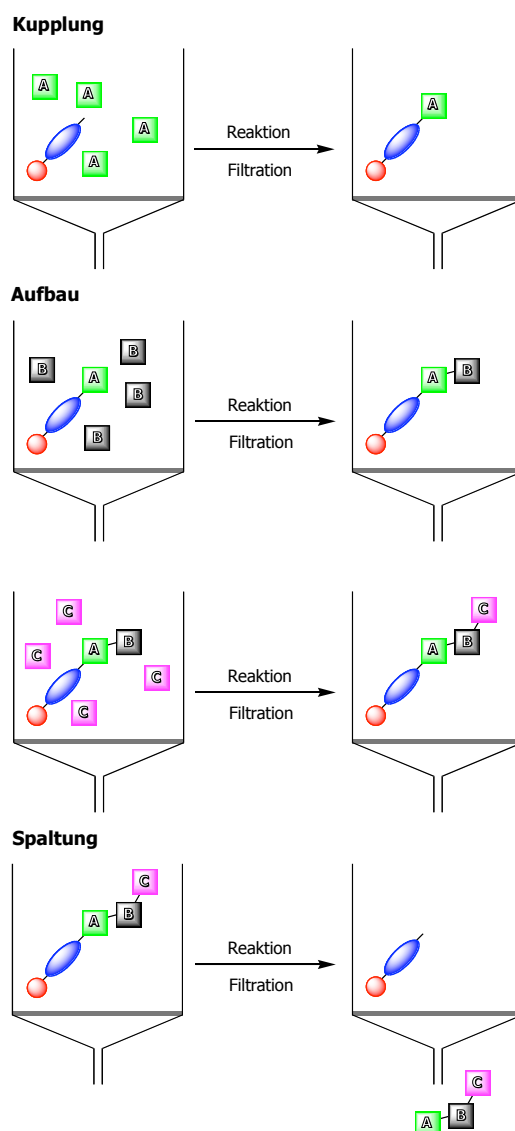


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Festphasensynthese

Eine schematische Darstellung des Festphasenaufbaus ist in *Abbildung 10* dargestellt. Dabei wirken drei Komponenten zusammen: Polymermatrix (das Trägerharz), Linker und Substrat.

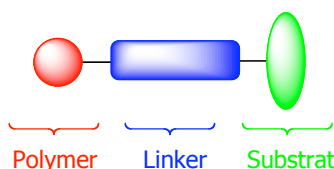


Abbildung 10 Schematische Darstellung des Festphasenaufbaus

Auf die für Synthesen zur Verfügung stehenden Trägerharze und Linker wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

1.2.3.1 Das Trägerharz

Merrifield verwendete für die von ihm ab 1963 eingeführte Festphasensynthese quervernetztes Polystyrol als Trägerharz.^{59, 60} Dieses Polystyrol bestand aus einem Copolymer aus Styrol und 5% Divinylbenzol (DVB), welches zur Vernetzung der einzelnen Stränge verwendet wurde. Der Anteil an DVB bestimmt neben der Stabilität des Harzes auch dessen Quellverhalten in verschiedenen Lösungsmitteln.⁶¹

Die Anforderungen an das Trägermaterial haben sich heutzutage aufgrund der Vielfältigkeit der Synthesen in der Festphasenchemie stark verändert. Ein Kompromiss zwischen Stabilität und Quellverhalten wurde mit dem heute üblich verwendeten Wert von 1-2% DVB gefunden. Es finden vorwiegend drei Typen von Polystyrolharzen Verwendung: das eigentliche Merrifieldharz Chlormethylpolystyrol, Hydroxymethylpolystyrol und Aminomethyl-polystyrol.^{62, 63}

Eine Weiterentwicklung des Merrifieldträgermaterials sind die von Bayer und Rapp entwickelten Tentagel- (TG) beziehungsweise Argogel-Harze (AG).⁶¹ Diese bestehen aus einem Polystyrolkern mit aufgepfropften Polyethylenketten, deren Enden funktionalisiert sind (PS-PEG-Harze). Sie gelangen bei sehr polaren Lösungsmitteln, aber auch bei Notwendigkeit einer zusätzlichen Distanz zum Hauptkern, zum Einsatz. Generell besitzen sie im Vergleich zum Merrifieldharz ein konstanteres Quellverhalten in vielen unterschiedlich polaren Lösungsmitteln (*Tabelle 5*).⁶⁴

Lösungsmittel	Wasser	MeOH	EtOH	DCM	Toluol	DMF	ACN	THF	Dioxan	Ether
Merrifield-Harz^a	-	1.6	1.7	8.3	8.5	5.6	3.2	8.8	7.8	4.0
Tentagel-Harz^b	3.6	3.6	2.9	6.3	4.8	4.7	4.2	5.0	5.4	1.9

^a Trockenvolumen Merrifield-Harz (0.3-2.5 mmol/g): 1.6 mL/g

^b Trockenvolumen Tentagel-Harz (0.25-0.3 mmol/g): 1.7 mL/g

Tabelle 5 Vergleich der Quellvolumen (in mL/g) von Merrifield-Harz und TentaGel-Harz

PS-PEG-Harze sind mechanisch sehr robust, was eine Durchmischung mittels starkem Schütteln, Ultraschall-Behandlung oder Durchblasen ermöglicht.

Immer häufiger gelangen in der Festphasensynthese sogenannte Laternen/Kronen oder Pins zum Einsatz. Diese bestehen aus einem Polyethylen- oder Polypropylenkern, auf den analog der anderen Harze funktionalisierte Ketten aufgebracht werden, die zur Chemie beziehungsweise zur Kupplung an den Linker benötigt werden.⁵³ Hingegen sind Kieselgur-, Glas- oder Goldträger nur von untergeordneter Bedeutung und gelangen vorwiegend bei kontinuierlichen Festphasensynthesen im Peptid- und Oligonukleotid-Synthesebereich zum Einsatz.^{65,}

66

1.2.3.2 Der Linker

Um den Polymerträger mit dem Substrat, dem eigentlichen Ort der chemischen Synthese, zu verbinden, wird ein chemisch spaltbares Verbindungsstück, der Linker, eingesetzt.

Der Linker muss mit dem Träger chemisch stabil verbunden werden, damit er die folgenden Syntheseschritte und die abschliessende Spaltung ohne Einfluss übersteht. Dabei sollte sowohl die Beladung des Linkers mit dem Startmolekül des Substrats als auch die Spaltung des Zielmoleküls nahezu quantitativ erfolgen, um eine grösstmögliche Ausbeute an Endprodukt zu erreichen.

Die Kombination von Trägerharz und Linker kann als unlösliche, immobilisierende Schutzgruppe angesehen werden. Die Entwicklung vieler Linker orientierte sich deshalb oft an gängigen Syntheschutzgruppen. Das heisst, unter gewissen chemischen Bedingungen existiert eine vollkommene Stabilität und unter anderen

Bedingungen eine chemische Labilität, die zur Abspaltung von der Festphase genutzt werden kann.

Linker müssen sehr hohen Anforderungen standhalten: Sie dürfen keinen Einfluss auf die nach der Kupplung folgenden Syntheseschritte haben, sie sollten eine definierte Stabilität besitzen und nicht zuletzt sollten sie unter möglichst milden chemischen Bedingungen abgespalten werden können. Aufgrund dieser unterschiedlichen Abspaltungsbedingungen können die Linker in die folgenden Klassen eingeteilt werden:

Elektrophil spaltbare Linker, nukleophil spaltbare Linker, photolabile Linker, „Safety-Catch“ Linker, „Traceless“ Linker.

Andere, jedoch seltener verwendete Linker, sind oxidativ, reduktiv, durch metallkatalysierte Prozesse oder durch intramolekulare Cyclisierungsprozesse spaltbar. Auf sie soll im weiteren Verlauf nicht näher eingegangen werden.

Elektrophil spaltbare Linker

Zur Abspaltung der Produkte von der Festphase wird hier meist mit Halogenen oder Protonen als elektrophilen Reagenzien gearbeitet. Die beiden bekanntesten Vertreter dieser Klasse sind die säurelabilen Wang-Linker **39** und Rink-Linker **40**.^{67, 68}

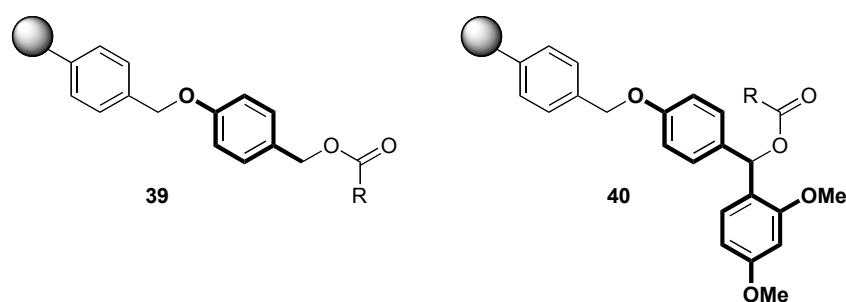


Abbildung 11 Wang- **39** und Rink-Linker **40**, R symbolisiert den immobilisierten Synthesebaustein

Nukleophil spaltbare Linker

Die Abspaltung erfolgt hier meist durch Verseifung einer Esterbindung durch O-Nucleophile beziehungsweise Aminolyse durch N-Nucleophile unter Herstellung von Amiden. Die Verseifung mit O-Nucleophilen gelangte bereits 1963 bei den ersten Festphasensynthesen von Merrifield aufgrund ihrer Orthogonalität zu den an den

Aminosäuren verwendeten Boc- und Z-Schutzgruppen zum Einsatz. Die wichtigsten Vertreter dieser Linker-Klasse sind der 4-Hydroxymethylbenzoyl Linker (HMBA) **41** und der Phenylacetamidomethyl-Linker (PAM) **42**.⁶⁹⁻⁷¹

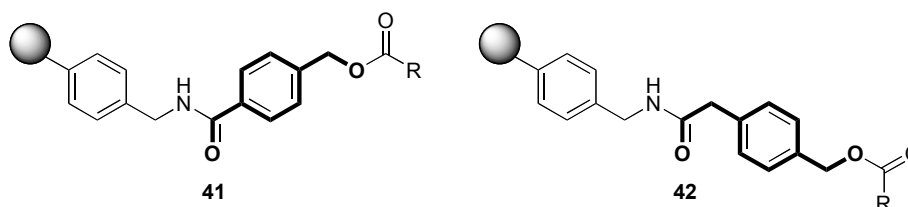


Abbildung 12 HMBA- **41** und PAM-Linker **42**, R symbolisiert den immobilisierten Synthesebaustein

Die Silyllinker benötigen sehr milde Abspaltungsbedingungen. Durch die hohe Si-F Affinität kann dieser Linkertyp durch Fluorid-Quellen leicht gespalten werden.^{72, 73}

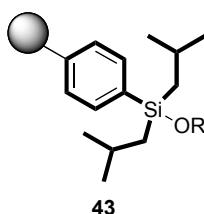


Abbildung 13 Beispiel eines Silyllinkers **43** von Danishefsky, R symbolisiert den immobilisierten Synthesebaustein

Photolabile Linker

Die Photolyse stellt eine milde und orthogonale Abspaltungsmethode unter neutralen Bedingungen dar. Photolabile Schutzgruppen sind in der Nucleotid- und Peptidsynthese weit verbreitet. Sie verlangen, dass das zur Spaltung notwendige Licht nur vom Linker absorbiert werden soll. Oftmals absorbieren jedoch auch die synthetisierten Moleküle selbst UV-Licht, was zu grossen Problemen (Veränderungen am Molekül, Zerfall des Moleküls) während der Abspaltung führen kann. Das grösste Problem ist aber durch die Festphase selbst gegeben, da das Licht oft nicht zu allen zu spaltenden Linkermolekülteilen durchdringen kann, was sich in Minderausbeuten niederschlägt. Der älteste und am häufigsten genutzte Typ dieser Klasse ist der von Rich entwickelte *ortho*-Nitrobenzyl-Linker **44**.⁷⁴

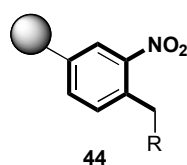
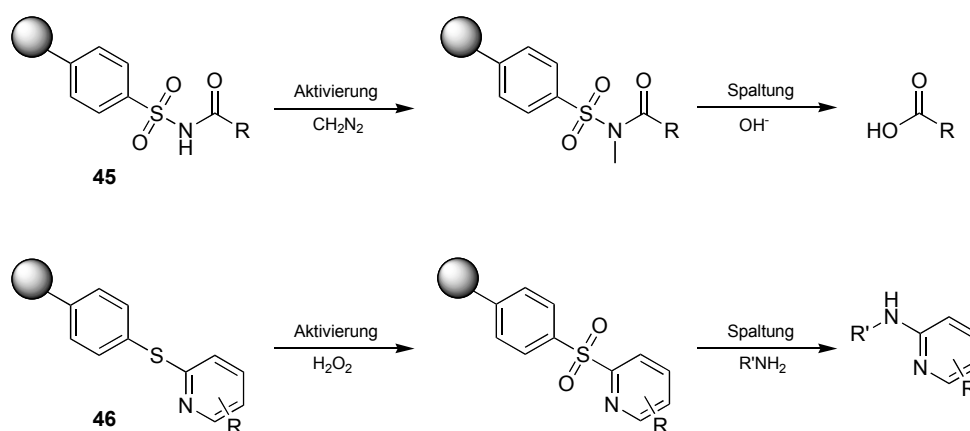


Abbildung 14 ortho-Nitrobenzyl-Linker **44**, R symbolisiert den immobilisierten Synthesebaustein

„Safety-Catch“ Linker

Die bis jetzt vorgestellten Linker funktionieren alle nach dem gleichen Schema: Unter bestimmten chemische Bedingungen sind die Linker nicht stabil und spalten die an der Festphase synthetisierten Verbindungen ab. Die „Safety-Catch“ Linker stellen eine neue Gattung der Linker dar. Ihre Spaltung erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende Stufen: Aktivierung und Spaltung. Der grosse Vorteil dieser Linker ist ihre sehr grosse chemische Stabilität gegenüber einer Vielzahl an Reaktionsbedingungen. Der Linker verhält sich während der Synthese inert und wird erst durch den Aktivierungsschritt in eine Form überführt, die es ermöglicht - meist unter sehr milden Bedingungen - die Spaltung durchzuführen. Der grosse Nachteil dieser Linkerkategorie sind die meist sehr drastischen Bedingungen, die für die Aktivierung nötig sind.

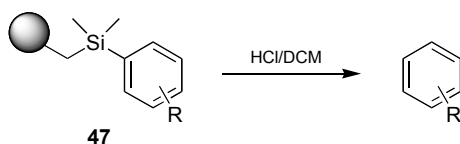
Im folgenden Schema sind der Kenner „Safety-Catch“ Linker **45** und der Pyridyl-Linker **46** mit Aktivierungs- und Spaltungsschritt dargestellt.⁷⁵⁻⁷⁹



Schema 4 Aktivierung und Spaltung von „Safety-Catch“ Linkern

„Traceless“ Linker

Die meisten Linker generieren bei der Abspaltung eine funktionelle Gruppe am abgespaltenen Molekül. Diese Gruppe wird benötigt, um das Molekül zu Beginn der Synthese mit dem Linker und der Festphase zu verbinden. Im Allgemeinen sind das Säure-, Amid- oder Alkoholfunktionen. Dies ist jedoch bei der Herstellung von Substanzbibliotheken nicht immer wünschenswert. „Traceless“ Linker sind Linker, die bei der Spaltung keine funktionellen Gruppen generieren, sondern lediglich Kohlenstoff-Kohlenstoff oder Kohlenstoff-Wasserstoff Bindungen am ursprünglichen Verbindungspunkt zu Linker und Festphase „zurücklassen“.^{80, 81}



Schema 5 Beispiel eines „Traceless“ Linkers **47**

1.2.4 Festphasensynthese von Cyclosporinen

Bei der Festphasensynthese von Cyclosporinen lassen sich zwei unterschiedliche Konzepte verfolgen. Zum einen eine kombinierte Synthese - an der Festphase sowie in Lösung - zum anderen eine komplette Synthese an der Festphase.

1.2.4.1 Kombinierte Synthese von Cyclosporinen

Bei der kombinierten Synthese von Cyclosporinen (A oder Derivate) wird die Peptidkette des Undecapeptids an der Festphase aufgebaut, anschliessend vom Trägerharz gespalten und schlussendlich in Lösung cyclisiert.

Wenger und Ko⁸² wählten dabei die Kupplungsstellen für die Cyclisierungsreaktion nach dem Gesichtspunkt aus, welche Aminosäuren der Kette am schwierigsten am Harz zu kuppeln wären. Ihre Vorversuche zeigten, dass sich vor allem die Aminosäuren 10 und 11 (MeLeu, MeVal), 9 und 10 (MeLeu, MeLeu), 5 und 6 (Val, MeLeu) und 11 und 1 (MeVal, MeBmt) des Undecapeptids sehr schwer verbinden liessen. Unter den genannten Verknüpfungsstellen war die Kupplung zwischen MeVal¹¹ und MeBmt¹ speziell schwierig. Auch nach mehreren Kupplungsversuchen von Fmoc-MeVal (aktiviert als symmetrisches Anhydrid) auf an Harz gebundenes MeBmt konnten keine brauchbare Ausbeute erzielt werden. Aufgrund dieser Erfahrung wurde die Festphasensynthese ausgehend von MeVal¹¹ gestartet und die Kette in Richtung N-Terminus mit den Aminosäuren 10 bis 1 aufgebaut. Die Cyclisierung sollte dann mit Hilfe eines präkonformierten Peptids zwischen den Aminosäuren 11 und 1 in Lösung erfolgen.

Die Synthese wurde an Wang-Harz unter Verwendung der Fmoc-Strategie durchgeführt.⁶⁷ Erst für die Kupplung der letzten Aminosäure wurde Boc-MeBmt verwendet. Anschliessend wurde mit Trifluoressigsäure sowohl die Boc-Schutzgruppe entfernt als auch das lineare Undecapeptid vom Harz gespalten. Das erhaltene Rohprodukt (Ausbeute >70%, HPLC-Reinheit >85%) wurde in Lösung mit BOP (Castros Reagens)³⁹ in hoher Verdünnung cyclisiert und anschliessend über Kieselgel gereinigt. Als häufigstes Nebenprodukt wurde dabei ein Cyclosporin Derivat mit D-MeVal¹¹ gefunden, welches durch Racemisierung während des Cyclisierungsschrittes entstand.

Wenger konnte auf dem geschilderten Weg sehr viele Cyclosporin-Analoga in kleinen Mengen herstellen und auf ihre biologische Aktivität hin überprüfen.

Rich⁸³⁻⁸⁵ verwendete eine von Wenger abweichende Synthesestrategie: Ausgehend von der Aminosäure 7 (Ala) synthetisierte er das lineare Undecapeptid in Richtung Aminosäure 6, 5, bis Aminosäure 8 (D-Ala). Nach der Abspaltung vom Harz und der Spaltung der Schutzgruppen wurde die Cyclisierung in Lösung mit verschiedenen Kupplungsreagenzien (PyAOP, BOP, (PrPO₂)₃)^{27, 40, 86} durchgeführt und ähnliche Kupplungsausbeuten wie bei Wenger erzielt. Wie bereits in *Kapitel 1.1.4.2.2.* beschrieben, handelt es sich bei der Kupplungsstelle für die Cyclisierung (D-Ala⁸-Ala⁷) um eine gängige Variante. Um die schwierige Kupplung zwischen MeVal¹¹ und MeBmt¹ zu umgehen, ersetzte Rich MeBmt¹ durch einfacher zu knüpfende Aminosäuren wie MeLeu, MeSer oder MeThr. Analog zu Wenger testete er die Cyclisierung zwischen den Aminosäuren 11 und 1, musste aber ebenfalls grosse Anteile an racemisierter Aminosäure 11 (D-MeVal) hinnehmen.

1.2.4.2 Komplette Synthese an der Festphase

Unter einer komplett an der Festphase durchgeführten Synthese von Cyclosporinen versteht man eine Synthese, bei der sämtliche Schritte (Aufbau der Peptidkette und Cyclisierung) an der Festphase durchgeführt werden. Erst ganz am Ende der Synthese wird das cyclische Peptid von der Festphase abgespalten.

In der bereits oben erwähnten Patentschrift von Rich⁸⁵ sind ebenfalls vollständig an der Festphase durchgeführte Synthesen von Cyclosporin-Analoga beschrieben. Als Startpunkt der Synthese wurde dabei wiederum die Aminosäure 7 gewählt. Jedoch wurde die Aminosäure Alanin in dieser Position durch ein Asparaginsäure-Derivat (Fmoc-Asp-OAllyl) ersetzt, welches eine Verknüpfung der Aminosäure mit dem Trägerharz über die Seitenkette erlaubte. Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte der Aufbau der Peptidkette in Richtung Aminosäuren 6, 5, bis 8. Vor dem Ringschluss wurden die orthogonalen Schutzgruppen (Fmoc- und Allyl-) abgespalten und anschliessend das Peptid am Harz cyclisiert. Auf diese Weise konnte nach der Abspaltung vom Harz [MeLeu¹, Asp⁷] CsA in einer Ausbeute von 35% hergestellt werden. Der grosse Nachteil der Methode ist der notwendige Ersatz von

Ala⁷ beziehungsweise MeBmt¹ durch Asp und MeLeu, wodurch sämtliche Eigenschaften von Cyclosporin A verloren gehen.

Neuere Arbeiten auf dem Gebiet der Festphasensynthese von Cyclosporin-Derivaten zeigen keine alternativen Kupplungs- und Cyclisierungsstrategien und verlaufen nach den hier beschriebenen Schemata ab.

Die schwierigen Kupplungsstellen zwischen den Aminosäuren 11-1, 10-11, 9-10 werden immer wieder genutzt, um neue Kupplungsreagenzien und Lösungsmittelgemische für die Festphasensynthese zu testen und die Synthesen zu optimieren.^{87, 88}

2 Aufgabenstellung

Aufgrund der nach wie vor anhaltenden Nachfrage nach Derivaten von Cyclosporin A und insbesondere der Hoffnung durch Modifikation des CsA-Peptidgerüsts neue, ähnlich potente Wirkstoffe wie Cyclosporin A selber zu finden, ist die Totalsynthese an der Festphase von regem Interesse.

Durch die in Kapitel 1.2 beschriebenen kombinatorischen Techniken wäre es mit dieser Plattform innerhalb kürzester Zeit möglich, tausende der möglichen Derivate herzustellen. Dies wiederum würde den einfachen Zugang zu Derivaten ermöglichen, die einerseits durch Biosynthese beziehungsweise durch modifizierte Fermentationsprozesse nicht herstellbar sind, andererseits nur mühsam über den Syntheseweg in homogener Phase zu entwickeln wären.

Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend von bestehenden Synthesen beziehungsweise Synthesemechanismen von Cyclosporin-Derivaten eine Totalsynthese von Cyclosporin A an der Festphase zu entwickeln.

Eine komplette Festphasensynthese von Cyclosporin A benötigt primär einen geeigneten Linker, der einen stufenweisen Aufbau der Peptidkette und eine abschliessende Cyclisierung zum cyclischen Undecapeptid erlaubt. Der Linker soll in Vorversuchen in homogener Phase entwickelt und getestet werden. Insbesondere die Stabilität, aber vor allem auch die Kompatibilität gegenüber den gängigen Festphasen-Peptidchemietechniken für Kupplung und Entschützung, sollen anschliessend an der Festphase überprüft werden. Der abschliessende Cyclisierungsschritt des linearen Undecapeptids soll durch die Synthese des linearen Vorläufers, ausgehend von Cyclosporin C, direkt an der Festphase getestet werden.

Im Anschluss an die Entwicklungsarbeit soll anhand einer Totalsynthese von Cyclosporin A an der Festphase gezeigt werden, dass das neu entwickelte System aus Festphase, Linker, Festphasen-Peptidsynthese und Cyclisierung am Harz funktioniert. Dieses System soll die Grundlage für eine kombinatorische Synthese von möglichst vielen neuen Cyclosporin-Derivaten in Zusammenarbeit mit der Firma Novartis bilden.

3 Untersuchungen zur Synthese eines geeigneten Linkers in homogener Phase

3.1 Einleitung

Die Totalsynthese von Cyclosporinen an der Festphase bedingt die Verwendung eines Linkers, der es ohne Veränderung der Peptidsequenz ermöglicht, einen Aufbau der linearen Peptidkette, aber auch die abschliessende Cyclisierung durchzuführen. Dies wiederum bedeutet, dass ein Linker gefunden werden muss, der entweder mit dem Rückgrat der Peptidkette oder mit der Seitenkette einer der verwendeten Aminosäuren verbunden werden kann.

Der Umstand, dass die Peptidsequenz von Cyclosporin A neben der unnatürlichen Aminosäure MeBmt nur aus aliphatischen Aminosäuren besteht, liess schon früh darauf schliessen, dass die Verknüpfung des Linkers mit der Peptidkette über die Seitenkette von MeBmt erfolgen müsste. Deshalb konzentrierte sich die Suche auf einen Linker, der sich mit der Hydroxygruppe in der Seitenkette von MeBmt verbinden liess. Linker zur Verbindung des Rückgrats der Peptidkette mit dem Harz wurden nicht in Betracht gezogen.

Die Grundvoraussetzungen, die der Linker erfüllen muss, bestehen aus den folgenden Punkten:

- Stabilität gegenüber den zum Aufbau der Peptidkette verwendeten Basen (Piperidin zur Spaltung der Fmoc-Schutzgruppen der Aminosäuren, Diisopropylethylamin während der Kupplungen der Aminosäuren)
- Stabilität gegenüber der zur Abspaltung der Schutzgruppen vor der Cyclisierung verwendeten Säure (Trifluoressigsäure)
- Stabilität gegenüber den zum Peptidaufbau verwendeten Chemikalien und Kupplungsreagenzien
- Milde Abspaltungsbedingungen, um das cyclisierte Endprodukt vom Harz zu spalten

3.2 Aus der Literatur bekannte Linker zur Immobilisierung und Freisetzung von Hydroxygruppen

In der Literatur lassen sich viele Linker zur Verknüpfung von Hydroxygruppen mit der Festphase finden. Die Linkertypen wurden nach den oben definierten Grundvoraussetzungen kritisch hinterfragt und ihre Verwendbarkeit für dieses Projekt geprüft.

3.2.1 Trityl- /2-Chlorotrityl-Linker

Die Trityl-Linker **48** wurden ursprünglich von Lezhoff und Fréchet entwickelt.⁸⁹⁻⁹¹ Dabei wurde Tritylchlorid genutzt, um einen Alkohol selektiv an die Festphase zu binden. Die Spaltung erfolgte durch TFA oder HBr. Später entdeckte Barlos den Nutzen für die Fmoc-Festphasen-Peptidsynthese (Kupplung der Säurefunktion der Aminosäuren). Durch Modifikation des Tritylgerüsts entwickelte die gleiche Arbeitsgruppe einen Chlor-substituierten Linker **49**, welcher eine erhöhte Stabilität des gebundenen Esters als der ursprüngliche Trityl-Linker aufwies.⁹²⁻⁹⁴ Für die Synthese von Cyclosporin A sind die Linker von diesem Typ jedoch ungeeignet, da vor der Cyclisierung ein t-Butylester mit TFA gespalten werden soll.

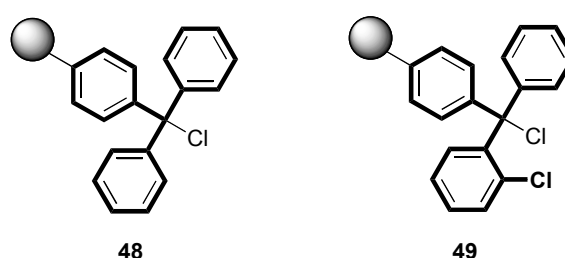


Abbildung 15 Trityl- und 2-Chlorotrityl-Linker **48/49**

3.2.2 Tetrahydropyran-Linker

Der Tetrahydropyran-Linker (THP-Linker) **50** wurde von Ellman als Schutzgruppe für Alkohole entwickelt.^{95, 96} Der Linker ist stabil gegenüber starken Basen und

Nukleophilen. Die Abspaltung erfolgt mit TFA/H₂O-Gemischen oder mit p-Toluolsulfonsäure. Aufgrund seiner Labilität gegenüber Säuren ist er als Linker für die Festphasensynthese von Cyclosporinen nicht verwendbar.

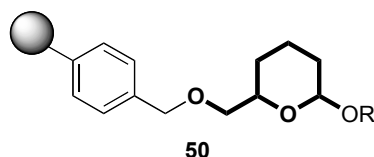


Abbildung 16 Tetrahydropyran-Linker **50**

3.2.3 Wang-Linker

1973 beschrieb Wang den p-Alkoxybenzylalkohol-Linker **51**, welcher die Spaltung von Peptiden unter relativ milden, sauren Bedingungen erlaubte.⁶⁷ Der Wang-Linker ist heutzutage der Standardlinker für die Synthese von Peptiden mit C-terminaler Säurefunktion unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppen Strategie.

Hanessian entwickelte einen Trichloracetimidat aktivierten Wang-Linker **52**, welcher die Verknüpfung eines Alkohols erlaubt.⁹⁷ Die Freisetzung erfolgt wiederum durch TFA, was seine Verwendung in dieser Synthese unmöglich macht.

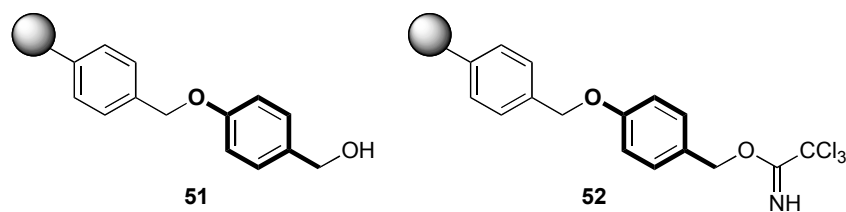


Abbildung 17 Wang-Linker **51** zur Immobilisierung von Säurefunktionen und modifizierter Wang-Linker **52** zur Immobilisierung von Hydroxyfunktionen

3.2.4 O-Nitrobenzyl-Linker

Albericio synthetisierte und verwendete einen modifizierten o-Nitrobenzyl-Linker **53** zur Peptidsynthese.^{74, 98} Der Linker ermöglicht die Kupplung von Alkoholen und Phenolen. Die Spaltung des Linkers erfolgt durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Ein photolabiler Linker wurde für die Synthese nicht in

Betracht gezogen, da für das verwendete Trägerharz (sogenannte Festphasenlaternen) bisher keine entsprechenden Anwendungen getestet wurden. Entsprechend ist unklar, ob eine vollständige Abspaltung durch Bestrahlung erreicht werden kann. Gleichzeitig sind photolabile Linker für die Festphasensynthese von Peptiden zu wenig verbreitet; auch hier fehlen entsprechende vergleichbare Beispiele.

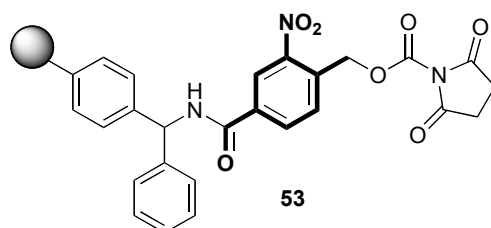


Abbildung 18 Modifizierter *o*-Nitrobenzyl-Linker **53** für die Peptidsynthese

3.2.5 Phenylacetyl-Linker

Die Verseifung von Estern wird allgemein genutzt, um Alkohole zu synthetisieren. Durch die Verwendung von säurefunktionalisierten Linkern **54** können Hydroxyfunktionen als Ester gebunden und durch basische Bedingungen wieder gespalten werden.⁹⁹⁻¹⁰³

Die Erfahrungen aus Arbeiten mit diesem Linkertyp sind in die Entwicklung des Linkersystems für die Festphasensynthese von Cyclosporin A eingeflossen.

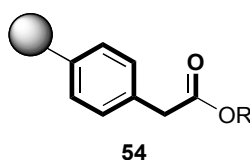


Abbildung 19 Säurefunktionalisierter Linkertyp **54**

3.2.6 Thioester-Linker

Alkohole können durch direkte Reduktion von Estern, gebunden an Merrifield-Harz, synthetisiert werden. Die besten Resultate wurden mit dem von Kobayashi

entwickelten Thioester **55** durch Reduktion mit Lithiumborhydrid erreicht.^{104, 105} Der Linker ist für dieses Projekt nicht geeignet, da der entsprechende Estervorläufer synthetisch nicht zugänglich ist, und zudem die Doppelbindung von MeBmt bei der Reduktion ebenfalls angegriffen würde.

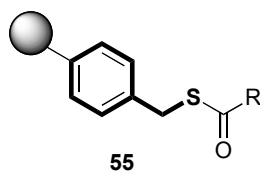


Abbildung 20 Thioester-Linker **55** von Kobayashi

3.3 Synthese der Linkermodellverbindungen

Ausgehend von den aus der Literatur bekannten Linkertypen konzentrierte sich die Arbeit schliesslich auf ein Linkersystem **56**, welches über eine Esterbindung mit der Hydroxyfunktion der Seitenkette der Aminosäure MeBmt¹ verbunden wird. Durch die Esterverbindung soll eine Orthogonalität gegenüber den verwendeten Spaltungsmethoden für die Fmoc- beziehungsweise tButyl-Schutzgruppenspaltung erreicht werden. Gleichzeitig ähnelt der Aufbau dieses Linkersystems einem „Safety-Catch“ Linker (*Kapitel 1.2.3.2*), welcher erst nach seiner Aktivierung unter sehr milden Bedingungen abgespalten werden kann:

Nach der Aktivierung des tertiären Amins durch erschöpfende Methylierung zum quaternären Ammoniumsalz, kann durch basische oder nukleophile Behandlung eine Reaktion initiiert werden, welche schlussendlich zur Spaltung der Esterbindung unter gleichzeitiger Freisetzung der Hydroxyfunktion der MeBmt-Seitenkette führt.

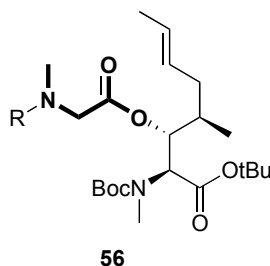
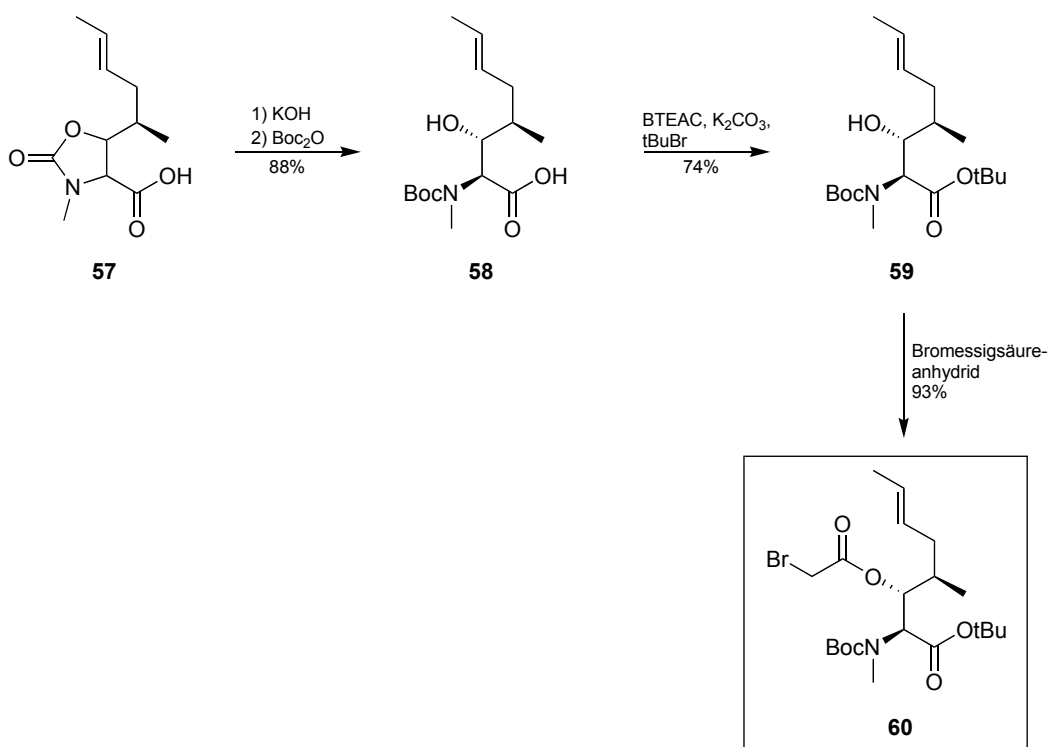


Abbildung 21 Linkermodell **56** für die Synthese von Cyclosporin A

3.3.1 Synthese des an MeBmt gebundenen Linkervorläufers

Die Synthese ging von einem cyclischen Vorläufer von MeBmt **57** aus, welcher in einem ersten Syntheseschritt durch basische Bedingungen mit KOH geöffnet und anschliessend mit Boc₂O am Aminoende zu Boc-MeBmt-OH (**58**) geschützt wurde. Danach wurde mit t-Butylbromid zur entsprechenden t-Butylesterverbindung **59** umgesetzt. Nach Veresterung der Hydroxyfunktion mit Bromessigsäureanhydrid gelangte man zum Vorläufer **60**. Dieser konnte anschliessend zur Alkylierung von sekundären Aminen und zur Herstellung der gewünschten Modellverbindungen genutzt werden.



Schema 6 Synthese des Linkervorläufers **60** aus MeBmt

Analog zur Synthese des oben dargestellten Vorläufers **60** erfolgte die Herstellung eines zweiten Vorläufers **61**, bei dem der entsprechende Linkerarm an der Seitenkette von MeBmt durch den Einsatz von Brombuttersäure anstatt Bromessigsäure um eine C_2 -Einheit verlängert wurde.

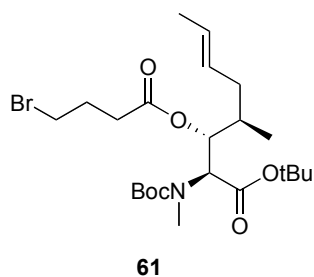
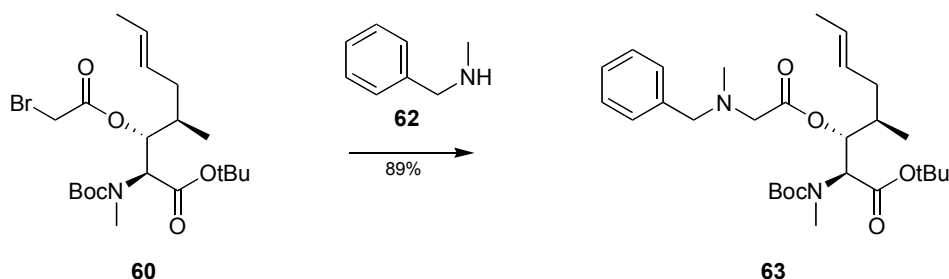


Abbildung 22 Struktur des um zwei C-Einheiten verlängerten Linkervorläufers **61**

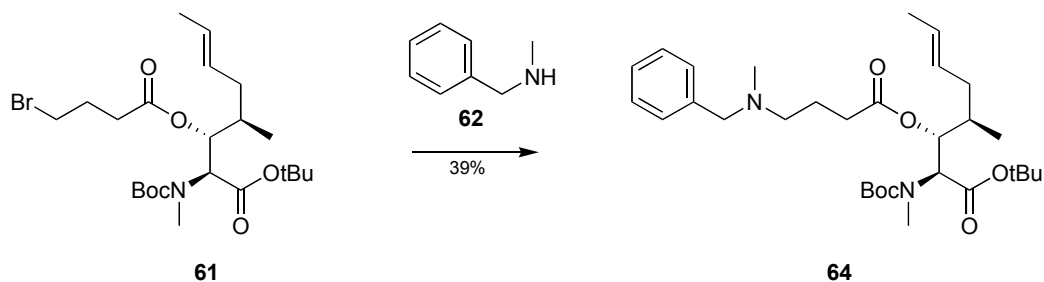
3.3.2 Kupplung des Linkervorläufers auf Amine

Als Modellverbindung für das später verwendete Harz diente Benzylmethylamin (**62**), welches durch Alkylierung in guter Ausbeute auf den Linkervorläufer **60** gekuppelt werden konnte. Aufgrund der zu erwartenden Dialkylierung bei der Kupplung von primären Aminen wurde auf deren Verwendung verzichtet.



Schema 7 *Synthese der Linkermodellverbindung **63***

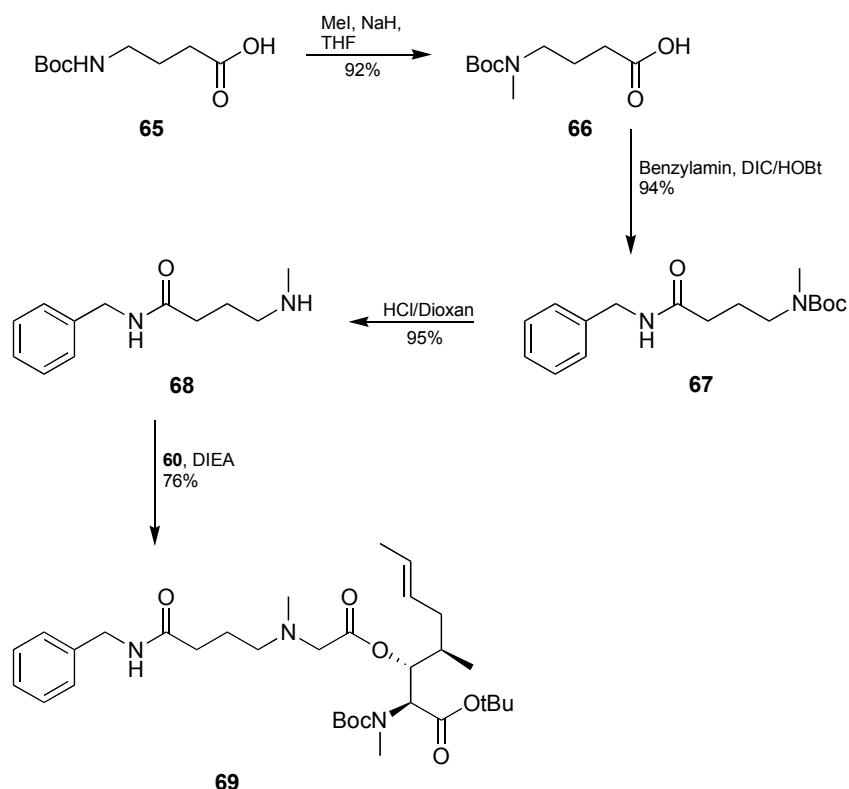
Die Umsetzung des Vorläuferbausteins **61** erfolgte unter den gleichen Bedingungen und lieferte in deutlich schlechterer Ausbeute eine zweite Modellverbindung **64** für die Untersuchung der Abspaltungsbedingungen.



Schema 8 *Synthese der Linkermodellverbindung **64***

Um die Spaltungsbedingungen auch in Bezug auf mögliche Spacer (Distanzgeber zwischen Harz und Linker beziehungsweise zu synthetisierender Verbindung) zu optimieren, wurde zusätzlich noch eine weitere Modellverbindung **69** synthetisiert. Ausgehend von einem geschützten Aminobuttersäurederivat **65** wurde mit Methyljodid und Natriumhydrid eine N-Methylierung durchgeführt.¹⁰⁶ Die vorhandene Boc-Schutzgruppe verhindert dabei eine erschöpfende Methylierung bis hin zum quaternären Ammoniumsalz. Nach der Kupplung dieses Bausteins **66** auf Benzylamin

67 und anschliessender Abspaltung der Schutzgruppe mit HCl in Dioxan erhielt man das um eine Buttersäureeinheit verlängerte sekundäre Amin **68** (Spacerverbindung). Dieses konnte danach in guter Ausbeute mit dem oben beschriebenen Linkervorläufer **60** zur Reaktion gebracht werden und lieferte die dritte Modellverbindung **69**, welche für die ersten Optimierungsversuche der Abspaltung genutzt wurde.



Schema 9 *Synthese der Spacerverbindung **68** und anschliessende Kupplung zur Linkermodellverbindung **69***

3.4 Spaltung der Modellverbindungen in homogener Phase

Der oben geschilderte Prozess für eine erfolgreiche und vor allem möglichst quantitative Abspaltung des synthetisierten Peptids bzw. der gekuppelten Aminosäure beinhaltet zwei Stufen:

a) die Aktivierung des Linkers durch N-Methylierung zum quaternären Ammoniumsalz und

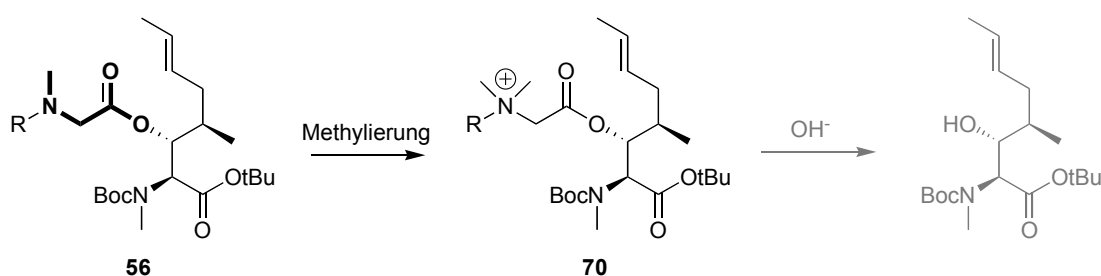
b) der eigentliche Spaltungsschritt zur Freisetzung.

Der Aktivierung kommt dabei die gleiche Bedeutung zu wie der Abspaltung, da ohne eine vollständige Aktivierung des Linkers die Voraussetzung nicht gegeben ist, dass eine vollständige Abspaltung unter milden Bedingungen erreicht wird. Das ausgearbeitete Linkermodell beinhaltet diesen Aktivierungsschritt, um die Abspaltung unter weniger drastischen chemischen Bedingungen zu ermöglichen. Drastischere chemische Abspaltungsbedingungen würden die synthetisierten Peptide zusätzlich belasten oder unter Umständen gar zerstören.

Die Reaktionsbedingungen wurden für beide Schritte getrennt untersucht und sind in den nachfolgenden Kapiteln erläutert.

3.4.1 Methylierungsbedingungen für den Linker

Die erschöpfende N-Methylierung des Linkers zum quaternären Ammoniumsalz dient als eigentliche Aktivierung des Linkers.



Schema 10 Spaltungsmodell Stufe 1, N-Methylierung

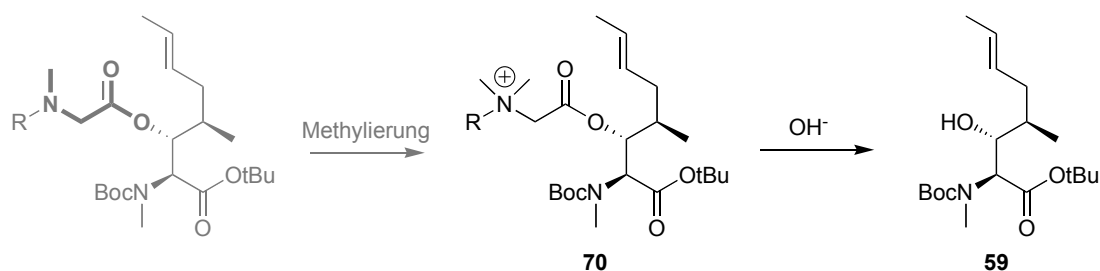
Die Bildung des quaternären Ammoniumsalzes ermöglicht die anschliessende Abspaltung unter milden Bedingungen. Es können jedoch nur Methylierungsmittel zum Einsatz gelangen, die einerseits eine vollständige Methylierung ermöglichen, andererseits aber keine unerwünschten Nebenreaktionen am abzuspal tenden Molekül hervorrufen.

Zur N-Methylierung der zu aktivierenden Modellbausteine **63**, **64** und **69** wurde ausschliesslich Methyljodid verwendet. Eine Untersuchung alternativer N-Methylierungsmittel wurde erst später an der Festphase (*Kapitel 4.5.2*) durchgeführt.

Die Modellbausteine konnten mit Methyljodid nach kurzer Reaktionsdauer in die gewünschten quaternären Ammoniumsalze überführt werden. Eine Umsetzung in reiner Methyljodidlösung lieferte dabei, wie nicht anders zu erwarten, die schnellsten Reaktionszeiten. In Mischungen mit Methylenchlorid beziehungsweise in Methylenchlorid unter Zugabe von bestimmten Äquivalenten an Methyljodid dauerte die Umsetzung deutlich länger oder führte gar zu Mischungen von nicht umgesetztem Edukt und Produkt. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde im folgenden in homogener Phase immer mit reiner Methyljodidlösung zur N-Methylierung gearbeitet.

3.4.2 Spaltung der Modellsubstanzen

Die Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) aus der durch N-Methylierung aktivierten Modellverbindung **70** wurde zunächst mit anorganischen Basen getestet.



Schema 11 Spaltungsreaktion Stufe 2, Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**)

Dabei zeigte sich, dass die Basenstärke und vor allem auch die verwendeten Äquivalente an Base einen sehr grossen Einfluss auf die Spaltung ausüben (*Tabelle 6*). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass bei Verwendung zu starker Basen ein Nebenprodukt gebildet wurde, welches als Dehydroprodukt **71** von Boc-MeBmt-OtBu identifiziert werden konnte.

Base	Äquivalente	Freisetzung	Nebenprodukt/e
Na ₂ CO ₃ *ohne Aktivierung	5	Keine	-
H ₂ O *	-	Keine	-
NaHCO ₃	5	Teilweise	-
NaHCO ₃	10	Vollständig	-
Na ₂ CO ₃	5	Vollständig	-
K ₂ CO ₃	5	Vollständig	DehydroMeBmt (71)
NaOMe	5	Vollständig	DehydroMeBmt (71)

Tabelle 6 Spaltverhalten bei der Verwendung unterschiedlicher Basen. Die mit * gekennzeichneten Experimente wurden zur Kontrolle durchgeführt

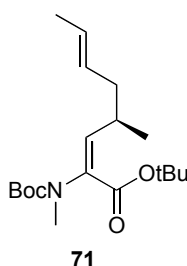
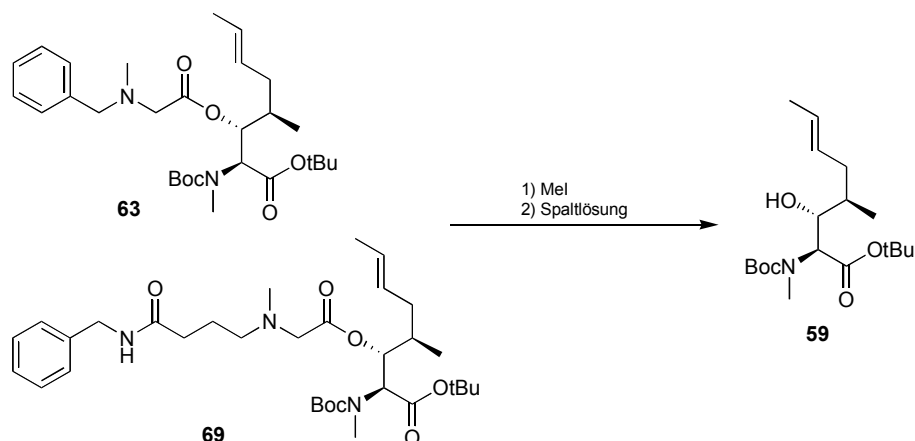


Abbildung 23 Nebenprodukt der Abspaltungsreaktionen mit zu starken Basen, DehydroMeBmt (**71**)

Die zur vollständigen Spaltung benötigten Reaktionszeiten variierten stark, lagen jedoch sehr oft bei 12 oder mehr Stunden. Aufgrund der zu erwartenden Probleme im Quellverhalten der Festphase in wässrigen Lösungen (*Kapitel 1.2.3.1*) und in Gemischen aus wässrigen Basen mit organischen Lösungsmitteln, wurde alternativ ein System mit MeOH bzw. MeOH/DCM Gemischen als Spaltlösungen ausgetestet. Dabei konnte ausgehend von den Modellverbindungen **63** und **69** Boc-MeBmt-OtBu (**59**) in sehr guten Ausbeuten freigesetzt werden. Das unerwünschte Nebenprodukt **71** konnte gleichzeitig nicht mehr nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Ausbeute an Boc-MeBmt-OtBu (**59**) erfolgte mittels HPLC über interne Standards und Flächenfaktoren.



Ausgangsverbindung	Spaltlösung	Reaktionszeit	Ausbeute
63	DCM	48 h	0%
69			0%
63	DCM/MeOH 3:1	24 h	85%
69			95%
63	DCM/MeOH 1:1	24 h	99%
69			86%
63	MeOH	24 h	86%
69			88%
63	MeOH (ohne Aktivierung)	48 h	0%
69			0%

Tabelle 7 Ausbeute an Boc-MeBmt-OtBu (**59**) ausgehend von den Modellverbindungen **63** und **69**

Analog der oben beschriebenen Experimente mit den Modellverbindungen **63** und **69** wurden auch Versuche mit der Modellverbindung **64** (siehe *Kapitel 3.2.2*) mit verlängerter C-Kette zwischen Amin und Esterfunktion durchgeführt. Dabei konnte selbst nach sehr viel längerer Reaktionszeit in DCM/MeOH kein Boc-MeBmt-OtBu (**59**) nachgewiesen werden. Das aktivierte Ammoniumsalz wurde nach Aufarbeitung unverändert zurückgewonnen. Da für die Verwendung dieses, im Vergleich zu **63** und **69**, veränderten Linkersystems drastischere Spaltbedingungen nötig wären, wurde dieser Weg nicht weiterverfolgt.

Die Ergebnisse für die Aktivierungs- und Spaltbedingungen lieferten die Grundlage für erste Experimente mit dem entwickelten Linkersystem an der Festphase.

4 Untersuchungen zur Synthese eines Linkers an der Festphase

4.1 Einleitung

Die in der homogenen Phase durchgeführten Synthesen der Linkermodelle und die anschliessende Entwicklung der Aktivierung und der Spaltung des Linkers dienen zur Abklärung der Verwendbarkeit des kompletten Linkersystems für eine Synthese von Cyclosporin A an der Festphase. Die nachfolgenden Kapitel schildern die Optimierung und die Übertragung der in der homogenen Phase gefundenen Ergebnisse für das Linkersystems auf die Gegebenheiten der Synthese an der Festphase. Dabei beinhaltet ein System zur Synthese an der Festphase folgenden Bestandteile: das Trägermaterial (Festphase, Harz), den Spacer (Distanzgeber) und der eigentliche Linker (Verbindung zum herzustellenden Molekül).

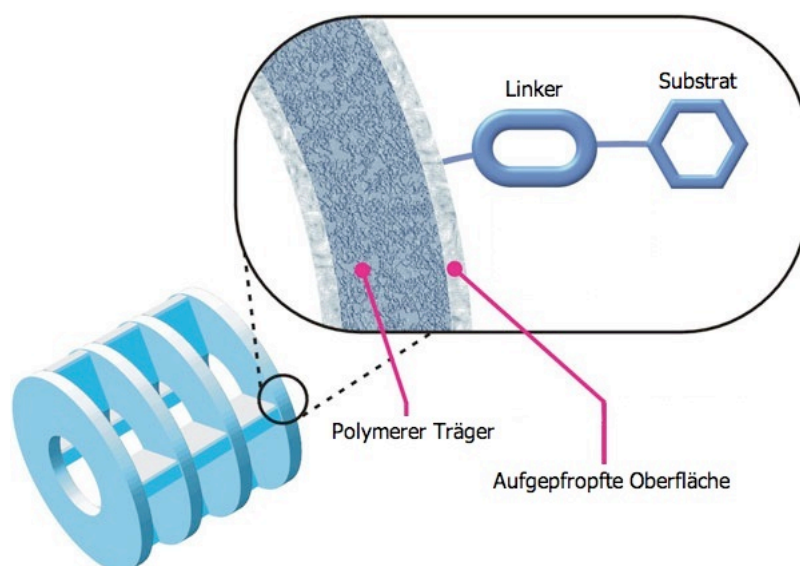
4.2 Trägermaterial

Verschiedene Trägermaterialien wurden bereits in *Kapitel 1.2.3.1* vorgestellt. Peptidsynthesen werden normalerweise an Polystyrolharzen durchgeführt. Polystyrolharz bietet in vielen für die Peptidsynthese gängigen Lösungsmitteln ein gutes Quellverhalten, welches eine gute Zugänglichkeit zu den vorhandenen Kupplungsstellen am Trägermaterial ermöglicht. Das in dieser Arbeit verwendete Trägermaterial, sogenannte Laternen, sind eine Weiterentwicklung des gängigen Polystyrolharzes in Kugelform.



Abbildung 24 SynPhase Laternen der Firma Mimotopes

Die verwendeten Laternen bestehen aus einem unreaktiven, polymeren Träger, auf dessen Oberfläche ein weiteres Polymer (Polystyrol oder Polyamid) aufgepfropft wird. An der Oberfläche finden die chemischen Reaktionen statt.



Schema 12 Schematische Darstellung der SynPhase Laterne¹⁰⁷

Der Aufbau der Laternen bewirkt eine sehr grosse Oberfläche bei gleichzeitig sehr hohe Stabilität des Trägers. Die Laternen besitzen gegenüber Polystyrolharz in der klassischen Form grosse Vorteile:

- Kein Ein- und Auswägen des Trägermaterials nötig; jede Laterne besitzt die gleiche, definierte Beladung
- Einfache Handhabung und Filtration
- Kein Schütteln/Rühren der Reaktionslösung zum Ankurbeln der Reaktionskinetik nötig
- Optimierte Oberfläche und Form der Laternen ermöglicht kleine Reaktionsvolumen und eine schnelle Beseitigung des Reagenzienüberschusses

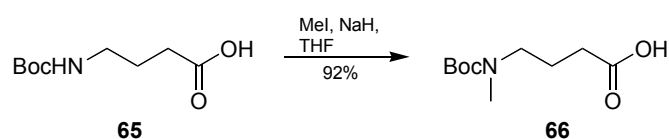
Die in dieser Arbeit verwendeten Laternen weisen eine Polystyroloberfläche auf, die mit Aminomethylgruppen derivatisiert ist (Beladung $\sim 37 \mu\text{mol}$). Die Möglichkeit einer Kennzeichnung der einzelnen Laternen mit Farb- oder Frequenzcode erlaubt eine einfache Parallelsynthese von vielen Derivaten (eine Verbindung pro Laterne).

4.3 Spacer

4.3.1 Synthese der verwendeten Spacerverbindungen

Wie bereits bei den Untersuchungen in der homogenen Phase wurden auch für die Festphasenmodelle zur Optimierung der Beladungsreaktionen, aber auch zur Verbesserung der allgemeinen Zugänglichkeit der Reagenzien im späteren Syntheseverlauf, mehrere Spacerverbindungen zur Vergrößerung der Distanz zwischen der Festphase und dem eigentlichen Reaktionszentrum synthetisiert. Dabei wurden die Spacereinheiten durch Verwendung unterschiedlicher Kohlenstoffketten in ihrer Länge variiert.

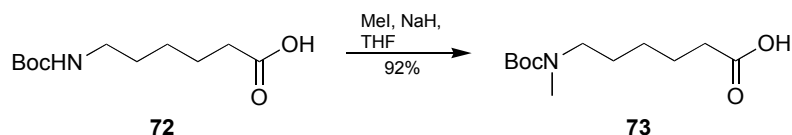
Die Herstellung der N-methylierten Aminobuttersäure **66** wurde bereits in *Kapitel 3.3.2* beschrieben. Dabei wurde N-Boc-geschützte Aminobuttersäure **65** mit Natriumhydrid und Methyljodid in guter Ausbeute N-methyliert.¹⁰⁶



Schema 13 *Synthese des Buttersäurespacers **66***

Die Verbindung **66** wurde anschliessend direkt zur Kupplung auf das Trägermaterial verwendet.

Analog zur oben beschriebenen Synthese konnte die geschützte Aminocaprinsäure **72** mit 92% Ausbeute N-methyliert werden.



Schema 14 *Synthese des Caprinsäurespacers **73***

Zusätzlich diene kommerziell erhältliches, Fmoc-geschütztes Sarcosin **74** als einfacher Baustein zur Erzeugung von Spacern.

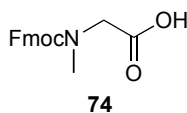
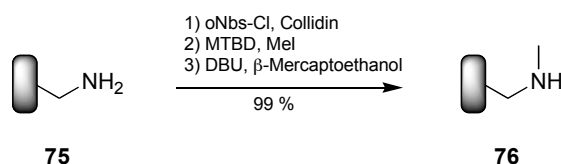


Abbildung 25 Fmoc-geschützte Sarcosineinheit **74**

4.3.2 Beladung der Festphasenlaternen mit Spacern

Um die Vor- und Nachteile der Verwendung von Spacern beurteilen zu können, wurden die nicht derivatisierten Aminomethyl-Laternen **75** nach einem einfachen Reaktionsschema N-methyliert und ebenfalls in Beladungstests eingesetzt.¹⁰⁸

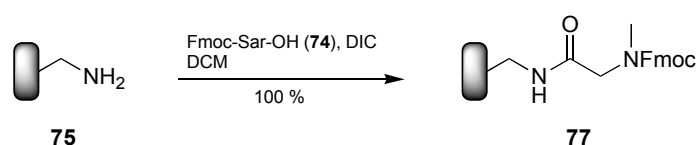


Schema 15 Synthese von N-methyliertem Trägermaterial **76** (Laternen Typ I)

Die verwendeten Festphasenlaternen der Firma Mimotopes wurden mit den verschiedenen Spacereinheiten beladen und anschliessend gängigen Verfahren der Beladungsbestimmung unterzogen.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Die Beladungsreaktionen der Laternen sind im folgenden beschrieben.

*Fmoc-Sarcosyl-Laternen **77** (Laternen Typ II)*

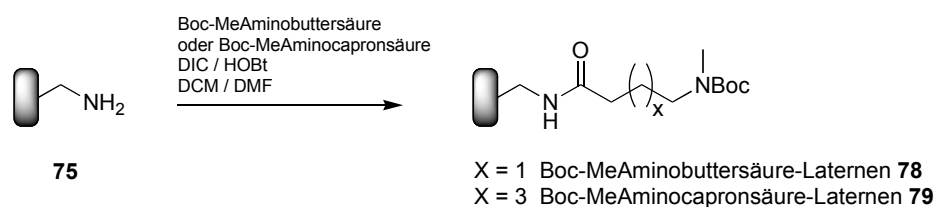
Fmoc-Sar-OH (**74**) wurde mit DIC zum symmetrischen Anhydrid umgesetzt und anschliessend auf die Laternen gekuppelt. Danach wurden die nicht abreagierten Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Beladungsbestimmung durch Fmoc-Spaltung und Quantifizierung durch UV-Absorptionsbestimmung ergab eine Beladung von 37.0 μmol , welche einer Kupplungsausbeute von 100% entspricht.



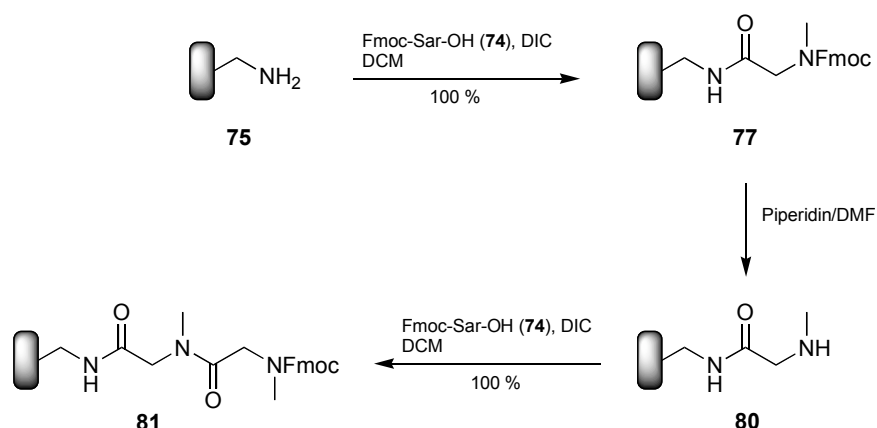
Schema 16 Synthese der Fmoc-Sarcosyl-Laternen **77**

*Boc-MeAminobuttersäure-Laternen 78 (Laternentyp III)**Boc-MeAminocaprinsäure-Laternen 79 (Laternentyp IV)*

Die Kupplung erfolgte durch Aktivierung der jeweiligen Säuren mit DIC/HOBt zum Aktivester und anschließender Reaktion mit den Aminogruppen der Laternen. Nicht abreagierte Aminogruppen wurden mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Beladungsbestimmung durch Boc-Spaltung und anschließende Quantifizierung durch Komplexbildung/-spaltung mit Pikrinsäure (UV) ergab Beladungen von 35.4 μmol (Aminobuttersäure) und 35.2 μmol (Aminocaprinsäure), was einer Kupplungsausbeute von 96% (Aminobuttersäure) respektive 95% (Aminocaprinsäure) entspricht.

**Schema 17** *Synthese der Buttersäure- und Caprinsäure-Laternen 78/79**Fmoc-Sarcosyl-Sarcosyl-Laternen 81 (Laternentyp V)*

Nach der Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe von Fmoc-Sarcosyl-Laternen **77** unter Verwendung von Piperidin in DMF erfolgte analog dem ersten Kupplungsschritt die Einführung einer zweiten Sarcosin Einheit. Nicht umgesetzte Aminogruppen wurden erneut mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Beladungsbestimmung durch Fmoc-Spaltung und Quantifizierung durch UV-Absorptionsmessung ergab eine Beladung von 37.0 μmol , was einer Kupplungsausbeute von 100% entspricht.

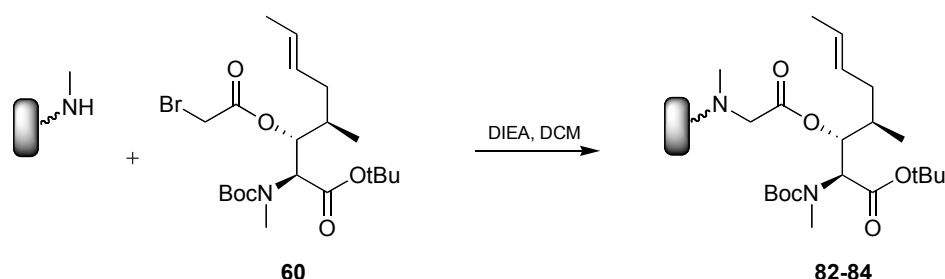


Schema 18 Synthese von Fmoc-Sar-Sar-Laternen **81**

4.4 Beladung der Laternen mit der ersten Aminosäure MeBmt

4.4.1 Beladung mit Boc-MeBmt-OH

Die ersten Beladungen der Laternen wurden mit Boc-MeBmt-OtBu durchgeführt. Als Synthesebaustein zur Kupplung diente das in *Kapitel 3.3.1* beschriebene Boc-MeBmt-OtBu Derivat **60**. Die Kupplung auf die entschützten Laternen erfolgte durch Alkylierung der freien Amine (Laternen) mit der Bromessigsäure-Seitenkette von MeBmt. Nach erfolgter Kupplung wurden nicht alkylierte Amine mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Für sämtliche verwendeten Laternentypen (I, III und IV) konnte das gleiche Kupplungsprotokoll verwendet werden.



Schema 19 Beladung der Laternen mit Boc-MeBmt-OtBu **60**

Folgende Derivate wurden hergestellt:

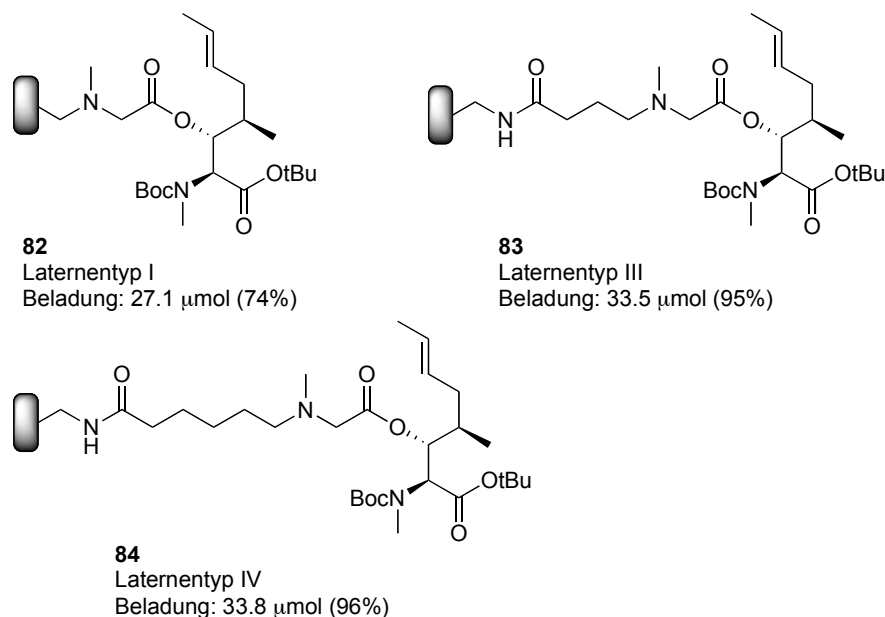


Abbildung 26 Laternenderivate **82-84**

Es zeigte sich, dass die Länge des Spacers keinen allzu grossen Einfluss auf die erreichbare Beladung ausübt. Generell ist aber klar erkennbar, dass die Verwendung eines Spacers einen grossen Einfluss auf die Beladungsausbeute hat, die durch den Einsatz von Spacern von >70% auf >90% steigt. Das unter *Kapitel 3.3.1* dargestellte Boc-MeBmt-OtBu Derivat **61** mit verlängertem Bromalkylsäure-Rest wurde nicht auf die Festphasenlaternen gekuppelt. Die Untersuchungen zur Abspaltung in homogener Phase hatten in diesem Fall keine Abspaltung des Produktes gezeigt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dieses Derivat nicht weiter untersucht.

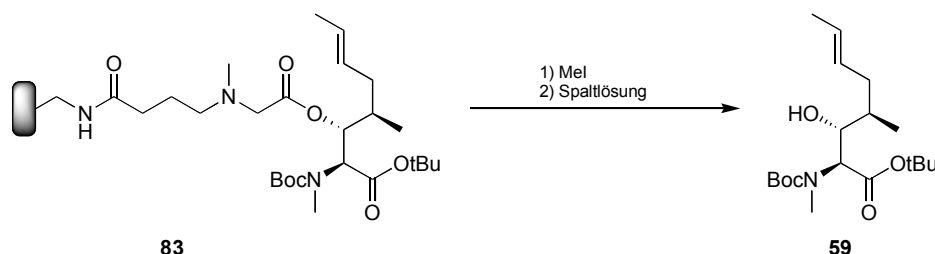
4.5 Abspaltung von Boc-MeBmt-OtBu von der Festphase

Analog der in homogener Phase durchgeführten Experimente zur Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu wurden die verschiedenen Laternenderivate aktiviert und gespalten.

4.5.1 Untersuchungen zur Spaltlösung

Zur Optimierung der Spaltlösung wurden beladene Laternen (Typ III, **83**) mit Methyljodid in Dichlormethan aktiviert und anschliessend mit Dichlormethan, Methanol und Gemischen der beiden Lösungsmitteln versetzt. Die Spaltlösungen wurden durch HPLC analysiert und der Gehalt an Boc-MeBmt-OtBu (**59**) über die ermittelten Peakflächen mit Hilfe von internen Standards quantifiziert.

Dabei zeigte sich, dass eine Spaltung der aktivierten Linker mit Hilfe von Dichlormethan allein nicht möglich ist. Erst nach Zugabe von Methanol zur Spaltlösung konnte das gewünschte Produkt (Boc-MeBmt-OtBu **59**) mittels HPLC nachgewiesen werden. Sämtliche Gemische, wie auch die Spaltlösung aus reinem Methanol lieferten sehr gute Ergebnisse. Diese deckten sich mit den in der homogenen Phase gefundenen Werten. Die besten Spaltergebnisse wurden mit einem Gemisch aus DCM/MeOH 3:1 erzielt. Dieses Gemisch wurde anschliessend für sämtliche Spaltexperimente während der Entwicklungsarbeit eingesetzt. Die gefundenen Ergebnisse können durch das bessere Quellverhalten der Festphase in DCM gegenüber MeOH erklärt werden (*Kapitel 1.2.3.1*).

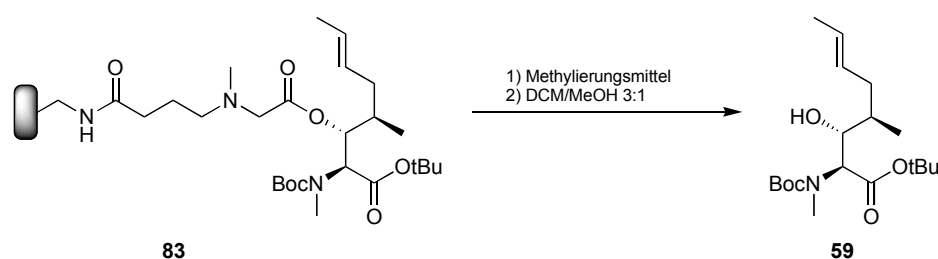


Spaltlösung	Reaktionszeit	Ausbeute
DCM	19 h	0%
DCM/MeOH 3:1	9 h	95%
DCM/MeOH 1:1	9 h	86%
MeOH	9 h	88%

Tabelle 8 Ausbeuten an Boc-MeBmt-OtBu (**59**) bei der Verwendung unterschiedlicher Spaltlösungen

4.5.2 Untersuchung der Aktivierungsbedingungen

Auf der Grundlage der bereits in der homogenen Phase verwendeten Aktivierungsbedingungen wurde als zweiter Parameter während des Spaltvorgangs die Aktivierung durch erschöpfende Methylierung untersucht. Die Laternen (Typ III, **83**) wurden eine Stunde lang mit verschiedenen Methylierungsmitteln versetzt und anschliessend mit einem Gemisch aus DCM/MeOH (3:1) den typischen Spaltbedingungen unterzogen. Die Quantifizierung Abspaltung erfolgte durch Untersuchung der Spatlösungen mittels HPLC.



Methylierungsmittel	Bedingungen	Reaktionszeit	Ausbeute
ohne		24 h	0%
Methyliodid	MeI (1 mL/~475 eq.)/1h	24 h	89%
Dimethylsulfat	10 eq./DCM 1 mL/1h	24 h	92%
p-Toluolsulfonsäuremethylester	10 eq./DCM 1 mL/1h	24 h	7%
Methyltriflat	10 eq./DCM 1 mL/1h	24 h	0%

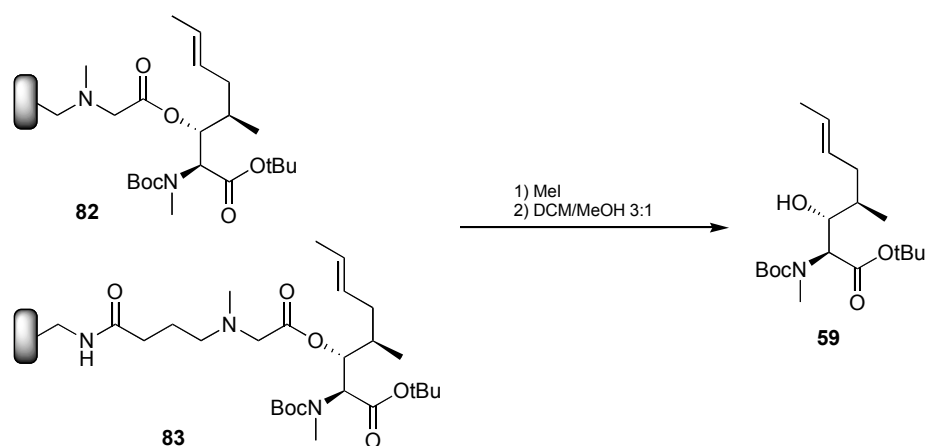
Tabelle 9 Einfluss des Methylierungsmittels auf die Abspaltung

Das verwendete Methylierungsmittel übt einen sehr grossen Einfluss auf die erzielten Abspaltungsausbeuten aus. Während Methyliodid und Dimethylsulfat ähnlich gute Abspaltungsergebnisse liefern, scheinen stärkere Methylierungsmittel wie p-Toluolsulfonsäuremethylester oder Methyltriflat neben der gewünschten Aktivierung des Linkers gleichzeitig auch noch unerwünschte Nebenreaktionen auszulösen. Als Standard-Methylierungsmittel wurde aufgrund der gefundenen Resultate fortan Methyliodid eingesetzt.

4.5.3 Untersuchung des Spacer-Einflusses auf die Abspaltung

Als letzter Parameter der Abspaltung wurde der Einfluss des Spacers auf die Abspaltungsausbeuten untersucht. Dabei wurden mit Boc-MeBmt-OtBu beladene Laternen des Typs I (**82**) und III (**83**) den vorher definierten Abspaltungsbedingungen (Aktivierung durch Methyljodid, Abspaltung mit Dichlormethan/Methanol) unterzogen und die erreichten Ausbeuten (quantifiziert mittels HPLC) verglichen.

Ein Einfluss des Spacers auf die Abspaltung ist analog zur Beladung nachweisbar. Der Unterschied ist im Falle der Abspaltung jedoch deutlich geringer; Typ I 79%, Typ III 83%. Es scheint, als hätte der Spacer vor allem einen Einfluss auf die Zugänglichkeit zum Reaktionszentrum beim Kupplungsschritt mit dem linkermodifizierten Boc-MeBmt-OtBu Baustein. Beim Aktivierungsschritt und der anschliessenden Abspaltung scheint dieser Einfluss von untergeordneter Bedeutung zu sein.



Ausgangsverbindung	Reaktionszeit	Ausbeute
82	48 h	79%
83	48 h	83%

Tabelle 10 Einfluss des Spacers auf die Abspaltung

4.6 Abspaltung von Fmoc-MeBmt-OtBu von der Festphase

4.6.1 Synthese des Vorläufers zur Beladung

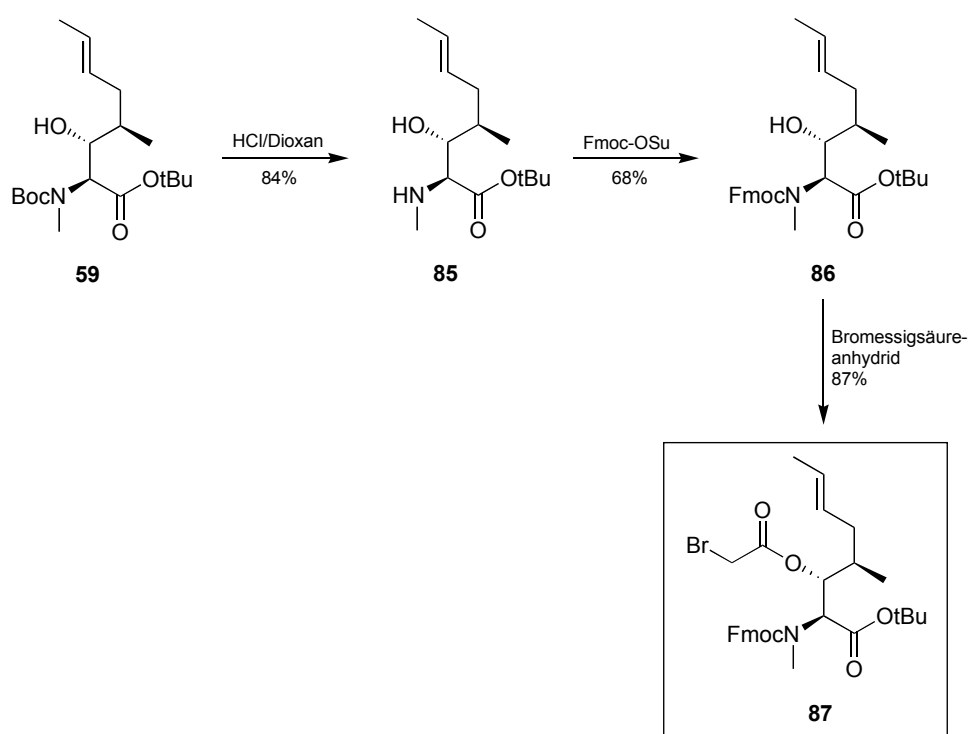
Die Synthesen und Kontrollexperimente zur Entwicklung des Linkersystems in der homogenen und an der Festphase brachten Probleme zu Tage, die durch eine Modifikation der Schutzgruppenstrategie für MeBmt¹ behoben werden konnten.

Das eingesetzte MeBmt-Derivat **59** wurde bis anhin während der Lösungssynthesen von Cyclosporin A eingesetzt.^{35, 48} Während der Lösungssynthesen war dies jedoch von untergeordneter Bedeutung, da als Carboxylschutzgruppe für die Aminosäuren Benzylester verwendet wurden. Nach den Kupplungen wurden die Boc-Schutzgruppen am Aminoende der Peptidketten gespalten, und das nächste Aminosäurederivat oder Peptidfragment (Boc-geschützt am Aminoende und entschützte C-terminale Carboxygruppe) gekuppelt. Die geschilderten Schritte wiederholten sich bis zur Bildung des gewünschten linearen Undecapeptids. Die Boc-Schutzgruppe verhielt sich vollständig orthogonal zu dem verwendeten Benzylester.

Für die Festphasensynthese von Cyclosporin A musste nun ein Derivat von MeBmt entwickelt werden, welches ebenfalls orthogonale Schutzgruppen enthält. Dies ist jedoch im Fall des zur Entwicklung des Linkersystems verwendeten Boc-MeBmt-OtBu **59** nur bedingt der Fall. Boc-Schutzgruppen lassen sich zwar in Gegenwart von tBu-Estern selektiv spalten,¹¹² was anhand von Spaltexperimenten von an Harz gebundenem MeBmt auch demonstriert werden konnte. Standardmässig wird jedoch heutzutage für Peptidsynthesen an fester Phase mit Fmoc-geschützten Aminosäuren gearbeitet. Dies hat mehrere Gründe: Fmoc-Schutzgruppen lassen sich schnell und quantitativ spalten und verhalten sich zu den in der Peptidsynthese verwendeten Linkertypen orthogonal. Die Beladung der Festphase lässt sich gleichzeitig genau bestimmen und quantifizieren. Das heisst eine Überprüfung des Synthesefortschritts lässt sich sehr einfach und schnell durchführen. Beide Vorteile der Fmoc-Schutzgruppenstrategie in der Festphasen-Peptidsynthese konnten für MeBmt¹ durch die Verwendung von Fmoc-MeBmt-OtBu (**86**) genutzt werden. Die Fmoc-Schutzgruppe verhält sich zur tBu-Ester Schutzgruppe vollkommen orthogonal, da sie basisch mit einem Gemisch aus Piperidin in DMF gespalten wird. In diesem

Spaltgemisch ist ein tButylester stabil. Gleichzeitig erreicht man durch die Verwendung dieses Derivates die gewünschte Verbesserung hinsichtlich Bestimmung der Beladungen. Bereits bei der ersten Spaltung der Schutzgruppe an der Festphase lässt sich die Fmoc-Festphasen-Strategie verfolgen.

Als Edukt zur Herstellung von Fmoc-MeBmt-OtBu (**86**) diene das entsprechende Boc-Derivat **59**, welches in einem ersten Schritt mit HCl in Dioxan am Aminoende entschützt wurde. Nach der Aufreinigung mittels Flash-Chromatografie wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit Fmoc-OSu eingeführt. Man erhielt in sehr guter Ausbeute das gewünschte Produkt **86**. Dieses konnte nun durch die bereits in *Kapitel 3.3.1* beschriebene Synthese in den entsprechenden Vorläufer **87** für die Kupplung an die Festphase überführt werden.



Schema 20 Synthese von Fmoc-MeBmt-OtBu (**86**) und des Vorläufers für die Beladung **87**

4.6.2 Beladung mit Fmoc-MeBmt-OtBu

Die Kupplung auf die Laternen erfolgte wieder durch Alkylierung der Amine mit der Bromessigsäure-Seitenkette von MeBmt. Nach erfolgter Kupplung wurden nicht alkylierte Amine mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Für die Testkupplungen wurden

Laternen des Typs I und III (siehe *Kapitel 4.3.2*) eingesetzt. Es zeigte sich, dass ohne Verwendung eines Spacers kein modifiziertes Fmoc-MeBmt-OtBu ans Harz gebunden werden konnte. Bei der Verwendung von Laternen des Typs III wurde eine Beladungsausbeute mittels Quantifizierung der Abspaltungsausbeuten durch UV-Messungen von 76% bestimmt. Dieser Wert liegt deutlich unter dem Wert für die Beladung von Typ III mit Boc-MeBmt-OH (96%).

Die sterische Hinderung durch die Fmoc-Schutzgruppe scheint die Beladung zu behindern oder sogar zu verunmöglichen. Eine Verlängerung des Spacers (Laternen Typ IV und V) führte jedoch zu keiner weiteren Verbesserung der Beladungswerte.

4.6.3 Abspaltung von Fmoc-MeBmt-OtBu

Die Abspaltungsexperimente wurden analog den Abspaltungen von Boc-MeBmt-OtBu (*Kapitel 4.5.3*) durchgeführt. Nach der Aktivierung des Linkers mittels erschöpfender Methylierung durch Methyljodid wurde in einem Gemisch aus Dichlormethan/Methanol (3:1) die Abspaltung vom Harz durchgeführt. Die gefundenen Abspaltungsausbeuten zeigten keine Abweichungen zu den im Fall von Boc-MeBmt-OtBu gefundenen Ausbeuten.

4.7 Zusammenfassung

Trägermaterial

Die verwendeten Festphasenlaternen auf Polystyrolbasis lieferten beste Ergebnisse. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und insbesondere wegen der Möglichkeit, genügend Substanz auf einem Träger herzustellen, haben sie für dieses Projekt grosse Vorteile gegenüber klassischen Trägern auf Kugelbasis (Beads).

Spacer

Es wurden verschiedene Spacermodelle synthetisiert und miteinander verglichen. Die Spacer konnten durch einfache Kondensationsreaktionen auf die Aminogruppen der Laternen angebracht werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Kettenlängen konnte aufgezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem verwendeten Spacer und der erreichbaren Grundbeladung bei der Kupplung der

ersten Aminosäure besteht. Die Spacer scheinen jedoch die Abspaltung der Aminosäure von der Festphase nicht zu beeinflussen.

Aktivierung und Abspaltung

Es wurden verschiedene Methylierungsmittel zur erschöpfenden N-Methylierung der Linkereinheit getestet. Starke Methylierungsmittel wie Methyltriflat führten zu unerwünschten Nebenreaktionen, die die Ausbeuten an freigesetztem Boc-MeBmt-OtBu (**59**) verringerten. Methyljodid bildete mutmasslich quantitativ das gewünschte Ammoniumsalz, welches nach Umsetzung mit ein Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (3:1) zur Freisetzung des gewünschten Endproduktes Boc-MeBmt-OtBu (**59**) führte. Ohne den Zusatz von Methanol erfolgte keine Spaltung.

Boc-MeBmt-OtBu versus Fmoc-MeBmt-OtBu

Ausgehend von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) konnte das entsprechende Fmoc-geschützte Derivat **86** synthetisiert werden. Dieses wurde aufgrund seiner orthogonalen Schutzgruppen Fmoc/OtBu als Alternative zum Boc-Derivat synthetisiert.

Die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe brachte bei der Abspaltung keine Nachteile im Vergleich zur Verwendung der Boc-Schutzgruppe mit sich, abgesehen von tieferen erreichbaren Grundbeladungen der Laternen. Als deutliche Vorteile zeigten sich die einfache und genaue Bestimmung der Beladung durch photometrische Quantifizierung des Spaltproduktes der Fmoc-Schutzgruppe, und die nun vollständige Orthogonalität der Schutzgruppen während der Synthese.

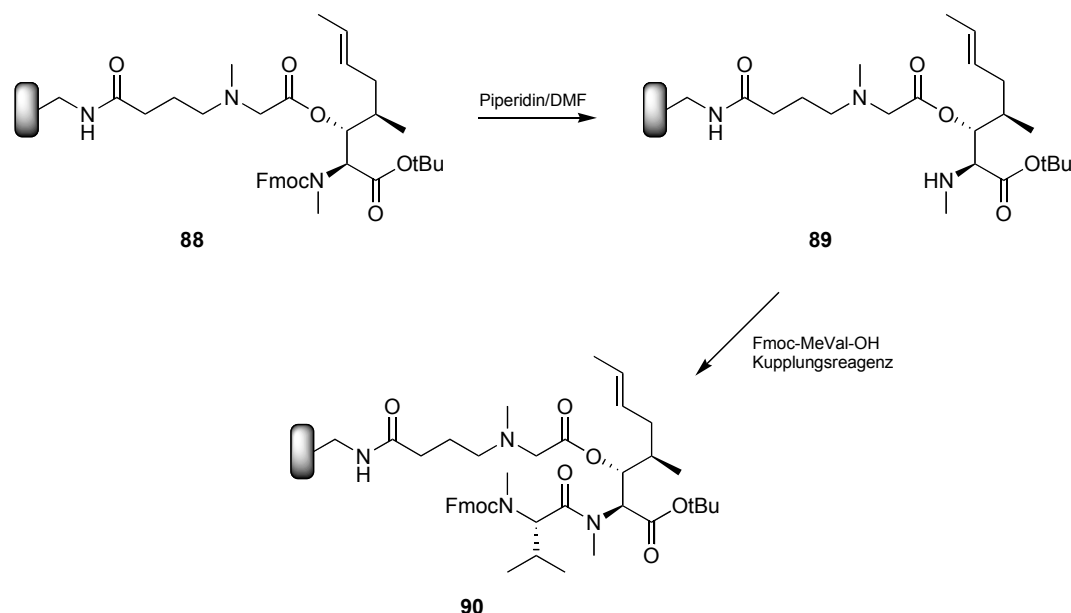
5 Aufbau der Peptidkette von Cyclosporin

Ausgehend von den Ergebnissen der Synthese des Linkers, der Spacer und vor allem der Abspaltungsbedingungen konnte mit den Untersuchungen zum Aufbau der linearen Undeca-peptidkette an der Festphase begonnen werden.

5.1 Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu

5.1.1 Herstellung durch klassische Festphasensynthese

Durch die Synthese der modifizierten ersten Aminosäure MeBmt **87** (Schema 20), welche direkt auf die Festphase gekuppelt werden konnte, wurde der Ausgangspunkt für den Aufbau der linearen Peptidkette von Cyclosporin A definiert. Bereits vor dem Start der Synthese war klar, dass es von entscheidender Bedeutung sein würde, ob die erste und wohl schwierigste Kupplung zum festphasengebundenen Dipeptid (MeVal-MeBmt) in guter Ausbeute gelingen würde. Der sterische Anspruch von Fmoc-MeVal-OH trifft bei dieser Kupplung auf den ebenfalls sehr grossen sterischen Anspruch von MeBmt, welches zusätzlich an der Seitenkette mit der Festphase verbunden ist.^{37, 113}

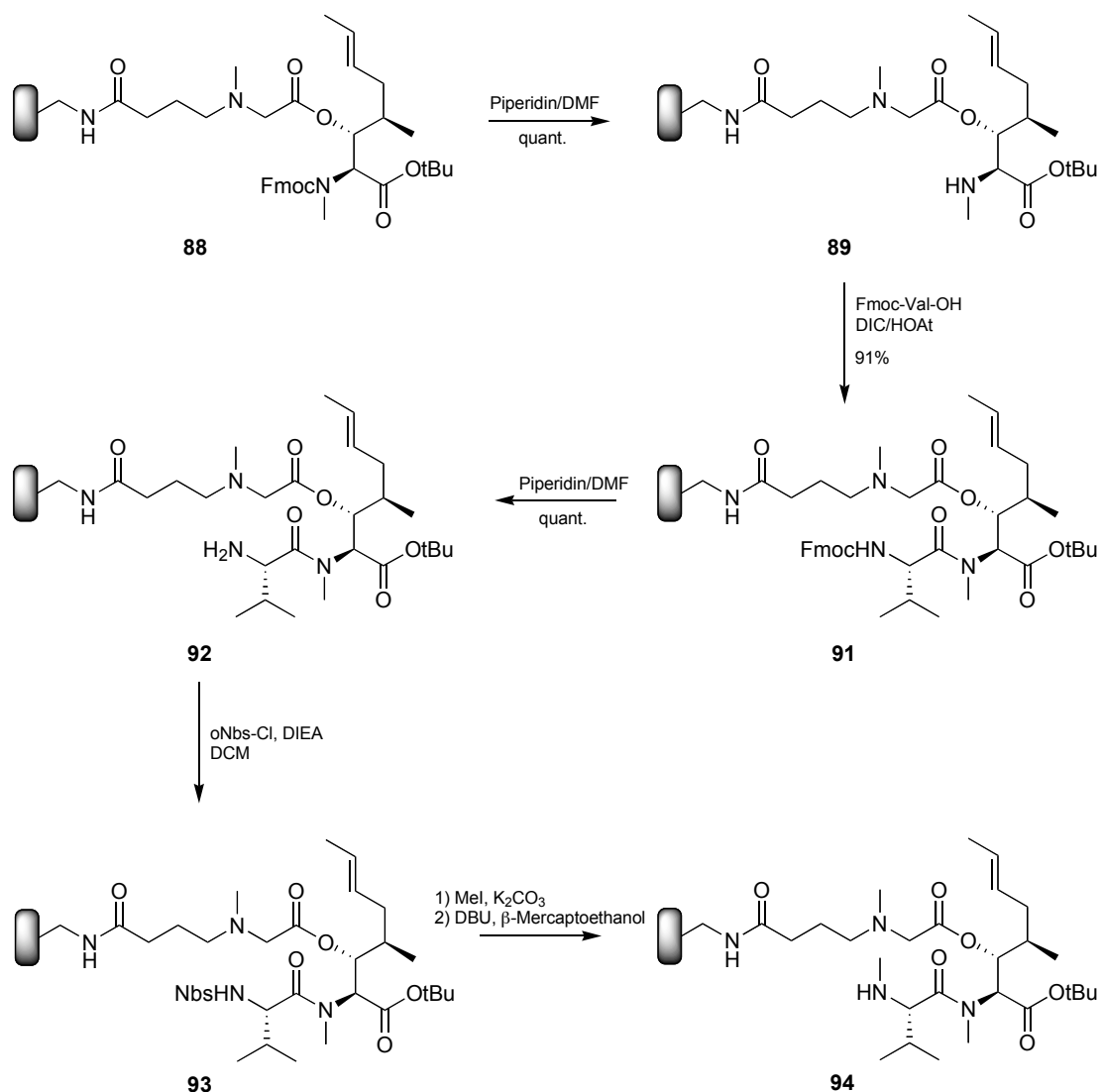


Schema 21 Festphasensynthese von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu **90**

An die Festphase gebundenes Fmoc-MeBmt-OtBu **88** wurde mit Piperidin in DMF entschützt. Obschon die Aktivierung von Fmoc-MeVal-OH und die anschliessende Kupplung mit dem entschützten MeBmt-Derivat **89** mit diversen Kupplungsreagenzien getestet wurde, konnte die Kupplung nur mit sehr geringen Ausbeuten von 10-20% durchgeführt werden. Da kein Kupplungsreagens gefunden werden konnte, welches einen deutlich höheren Umsatz ermöglichte, und somit diese erste Kupplung bereits mehr als 80% der maximal möglichen Ausbeute vernichtet, musste nach einem anderen Weg gesucht werden, um das Dipeptid **90** herzustellen.

5.1.2 Synthese durch N-Methylierung von Valin an der Festphase

Kupplungsversuche von nicht N-methylierten Aminosäuren an **89** zeigten, dass eine Bildung eines Dipeptids auf diesem Weg möglich ist. Sowohl Glycin, als auch Valin konnten in sehr guten Ausbeuten an MeBmt gekuppelt werden. Erst die Verwendung von N-methylierten Aminosäuren führte zu den oben geschilderten Kupplungsproblemen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein Syntheseweg getestet, welcher eine N-Methylierung von Valin an der Festphase beinhaltet.^{108, 114}

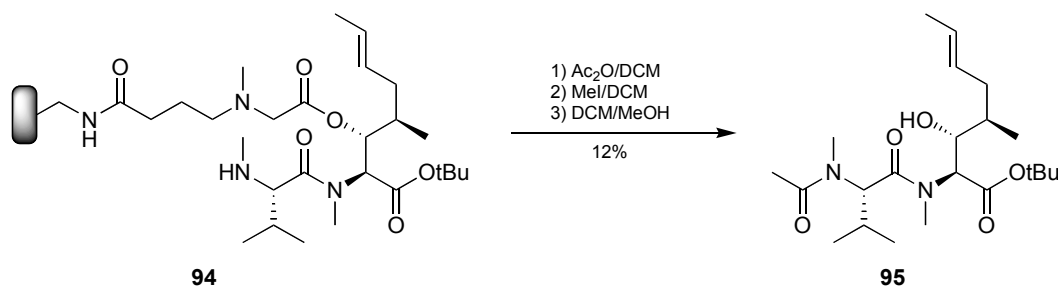


Schema 22 *Synthese von H-MeVal-MeBmt-OtBu **94** über N-Methylierung an der Festphase*

Durch Kupplung von Fmoc-Val-OH wurde das entsprechende Dipeptid **91** in guten Ausbeuten synthetisiert. Dieses wurde nach dem Austausch der Fmoc-Schutzgruppe gegen eine Nitrophenylsulfonylschutzgruppe in **93** umgewandelt. Anschliessend konnte mit Methyljodid die N-Methylierung von Valin durchgeführt und nach Abspaltung der Sulfonylschutzgruppe mit β-Mercaptoethanol das gewünschte N-methylierte Dipeptid **94** erhalten werden.

Die Umwandlung vom Fmoc-Val- zum Fmoc-N-MeVal-Derivat erfolgte auf diesem Weg nur in insgesamt mässiger Ausbeute. Nach der Acetylierung des am Aminoende entschützten Dipeptids **94** und anschliessender Anwendung der

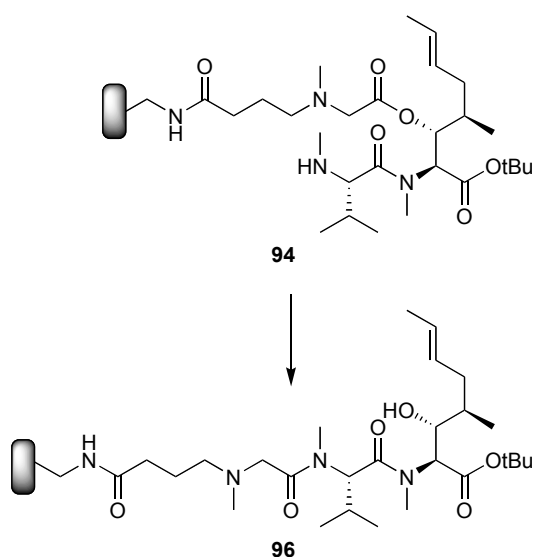
Abspaltungsbedingungen konnte das gewünschte acetylierte Dipeptid **95** nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden.



Schema 23 Freisetzung von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu (**95**)

Die folgenden Probleme scheinen eine der Literatur entsprechenden Ausbeute zu verunmöglichen:

- Der verwendete Linker ist nicht genügend stabil gegenüber den in der Reaktionssequenz verwendeten Reagenzien. Methyljodid, obwohl nicht im Überschuss eingesetzt, N-methyliert partiell das Linkersystem. Dieses wird somit aktiviert und gespalten.
- Nach der Abspaltung der Sulfonylschutzgruppe könnte ein O-N Acylshift stattfinden (siehe *Schema 24*). Dadurch würde das lineare System **96** entstehen, welches unter den verwendeten Spaltungsbedingungen nicht mehr gespalten werden könnte.

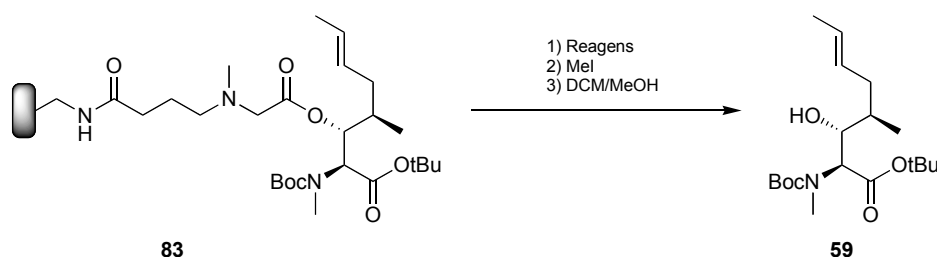


Schema 24 O-N Acylshift von H-MeVal-MeBmt-OtBu **96**

Aufgrund dieser Erkenntnisse und der nach wie vor unbefriedigenden Ausbeuten bei der Herstellung des Dipetids MeVal-MeBmt an der Festphase wurde dieser Syntheseweg verworfen.

5.1.3 Untersuchung zur Stabilität des Linkersystems

Aufgrund der bei der N-Methylierung am Harz aufgetretenen Labilität des Linkersystems gegenüber den eingesetzten Reagenzien wurde eine generelle Untersuchung der Stabilität der Verbindung zwischen Boc-MeBmt-OtBu und der Festphase durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Reagenzien getestet, von denen während der Synthese etliche zum Einsatz gelangen. Die mit Boc-MeBmt-OtBu beladenen Laternen wurden mit Lösungen der entsprechenden Reagenzien versetzt, während einer gewissen Zeit geschüttelt, anschliessend gewaschen und den Spaltbedingungen (Aktivierung und Spaltung) unterzogen. Die Spatlösungen wurden nach der Zugabe eines internen Standards per HPLC auf den Gehalt an Boc-MeBmt-OtBu untersucht. Die so bestimmten Resultate sind in der nachfolgenden *Tabelle 11* dargestellt.



Exp.	Reagens	Konzentration	Lösungsmittel	Reaktionszeit	Ausbeute nach Abspaltung
0	-	-	DCM	3 h	86%
I	DIEA	0.2 M	DCM	3 h	91%
II	DIEA	0.2 M	DCM	15 h	88%
III	TEA	0.2 M	DCM	3 h	91%
IV	DMAP	0.2 M	DCM	3 h	95%
VI	DBU	0.2 M	DCM	3 h	92%
VII	Piperidin	20%	DMF	1 h	82%
VIII	MTBD	0.2 M	DCM	3 h	62%
IX	Hydrazin	0.2 M	DCM	1 h	76%
X	HCl	4.0 M	Dioxan	1 h	30%

Tabelle 11 Stabilität des Linkersystems gegenüber Basen und Säuren

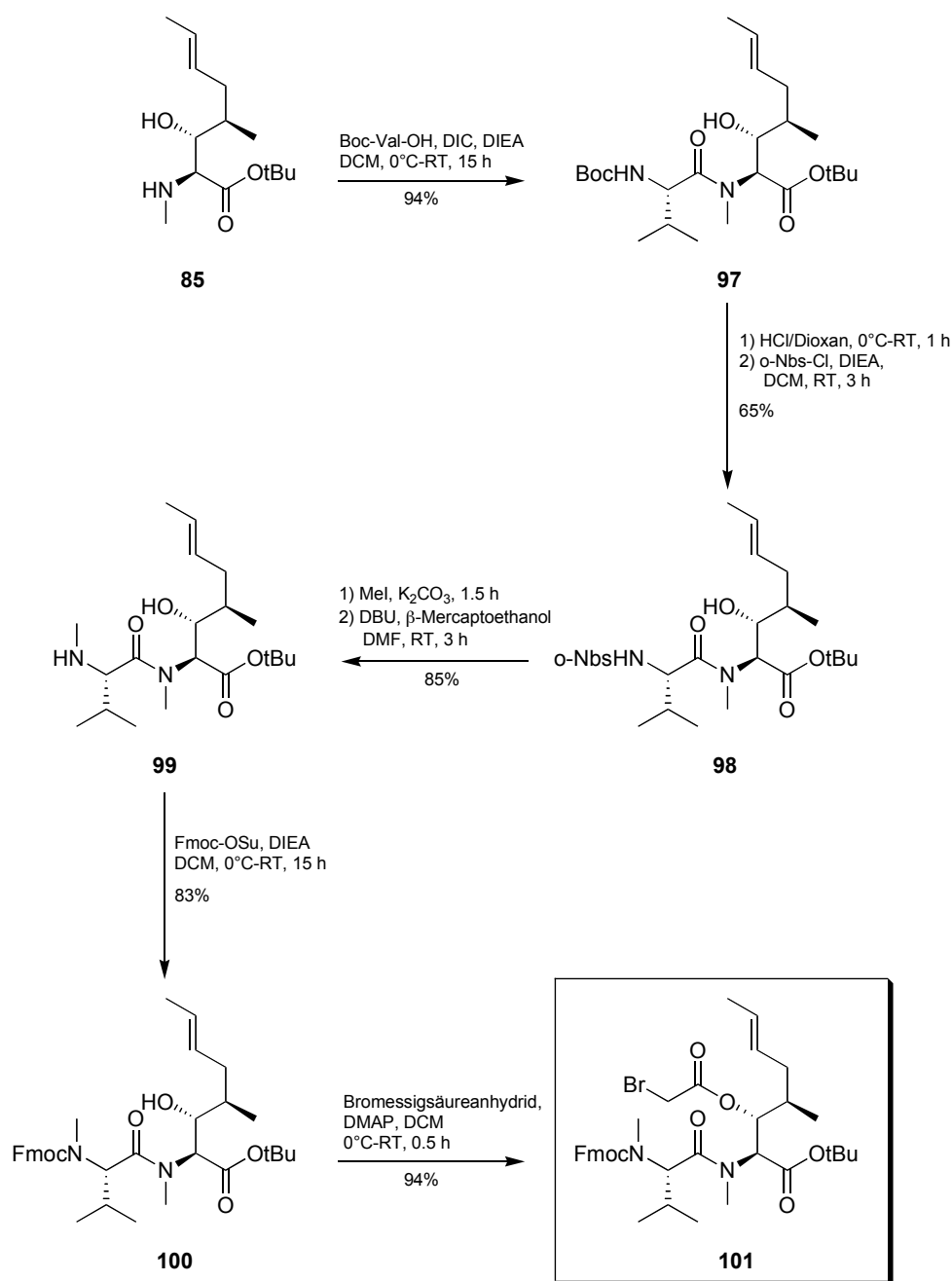
Die Resultate zeigen, dass sich das Linkersystem im Allgemeinen unter basischen Bedingungen und vor allem gegenüber den in der Synthese verwendeten Basen DIEA (Kupplung) und Piperidin (Spaltung Fmoc-Schutzgruppe) als stabil erweist. In der Gegenwart von HCl zeigt sich, dass das System später für die Abspaltung der Schutzgruppen (Boc- und -tBu) noch optimiert werden muss. Das gewählte System ist für die Überprüfung der Stabilität gegenüber Säuren nur bedingt verwendbar. Die partiell oder vollständig entschützten Derivate (Boc-MeBmt-OH, H-MeBmt-OtBu und H-MeBmt-OH) wurden im HPLC nicht quantifiziert. Dennoch konnte durch die Bestimmung des Gewichts des Eindampfrückstandes der Spatlösung nur eine kleine Menge nachgewiesen werden, was auf eine ebenfalls stattfindende partielle Spaltung des Linkers hinweist.

5.1.4 Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu als Vorläufer für die Kupplung an die Festphase

Ein Syntheseweg des Dipeptids Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu (**100**) über festphasengebundenes MeBmt konnte aufgrund der oben dargestellten Probleme (unvollständige Kupplungen, Labilität des Linkers gegenüber den verwendeten Reagenzien) nicht gefunden werden. Es wurde stattdessen die Synthese des Dipeptids in Lösung angestrebt. Die folgende Kupplung des Dipeptids an die Festphase soll den Einstieg in die Synthese von CsA erleichtern.

Die direkte Synthese des Dipeptids durch Kupplung von Fmoc-MeVal-OH an H-MeBmt-OtBu (**85**) konnte auch in Lösung nur mit geringen Ausbeuten erreicht werden. Zudem wurden in den isolierten Produkten grosse Anteile an Fmoc-D-MeVal-MeBmt-OtBu nachgewiesen. Es wurde deshalb eine neue Synthesestrategie ausgearbeitet:

Ausgehend von H-MeBmt-OtBu (**85**) konnte in einer fünfstufigen Synthese ein Dipeptid **101** als Vorläufer synthetisiert werden, das später direkt als Startbaustein an die Festphase gekuppelt werden konnte. Diese Synthese beinhaltet eine analoge Synthesestrategie, wie sie an der Festphase verfolgt und ausgetestet wurde. Das Linkersystem wird, aufgrund seiner Labilität gegenüber den zur N-Methylierung verwendeten Reagenzien, erst am Ende der Synthese eingeführt.



Schema 25 *Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu als Vorläufer **101** für die Kupplung an die Festphase*

In einem ersten Schritt erfolgte die Bildung des Dipeptides **97** durch Kupplung von Boc-Val-OH an das N-terminal entschützte MeBmt-Derivat **85**. Die Boc-Schutzgruppe des Dipeptids wurde anschliessend gespalten und mit o-Nbs-Cl aktiviert. Nach der N-Methylierung mit MeI und der nachfolgenden Abspaltung der o-Nbs-Schutzgruppe erhielt man das gewünschte Dipeptid **99**, welches mit Fmoc-OSu zum gewünschten Derivat **100** umgesetzt wurde. Die Einführung des Linkers erfolgte danach nach der

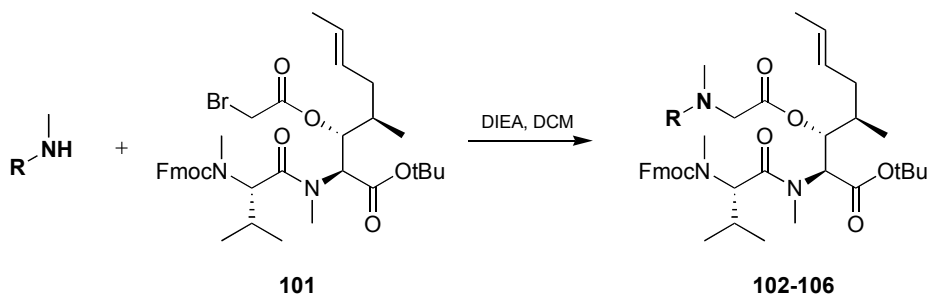
gleichen Methode wie für Boc- beziehungsweise Fmoc-MeBmt-OtBu **60/87** (*Kapitel 3.3.1*).

Durch diese Synthese konnte das gewünschte Dipeptid (Fmoc-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu, **101**) mit einer Gesamtausbeute von über 40% in Grammmengen hergestellt werden.

5.1.5 Kupplungs- und Abspaltungstests mit dem Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu Vorläufer

5.1.5.1 Beladung der Laternen mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu

Als Synthesebaustein zur Kupplung diente das in *Kapitel 5.1.4* beschriebene Derivat von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu **101**. Die Kupplung auf die entschützten Laternen erfolgte durch Alkylierung der freien Amine (Laternen) mit der Bromessigsäure-Seitenkette von MeBmt. Nach erfolgter Kupplung wurden nicht-alkylierte Amine mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Für sämtliche verwendeten Laternentypen (I-V; Herstellung *Kapitel 4.3.2*) konnte das gleiche Kupplungsprotokoll angewandt werden. Es zeigte sich, dass die Länge des verwendeten Spacers einen grossen Einfluss auf die erreichbare Beladung ausübt. Während bei der Verwendung der Standardlaternen (Typ I, ohne Spacer) nur eine geringe Beladung erreicht werden konnte, wurden Laternen des Typs V (doppelte Sarcosineinheit) beinahe vollständig alkyliert. Analog zur Beladung mit Boc-MeBmt-OtBu besteht in der erreichbaren Beladung bei Verwendung von Laternen des Typs III (Buttersäurespacer) und IV (Capronsäurespacer) nahezu kein Unterschied.

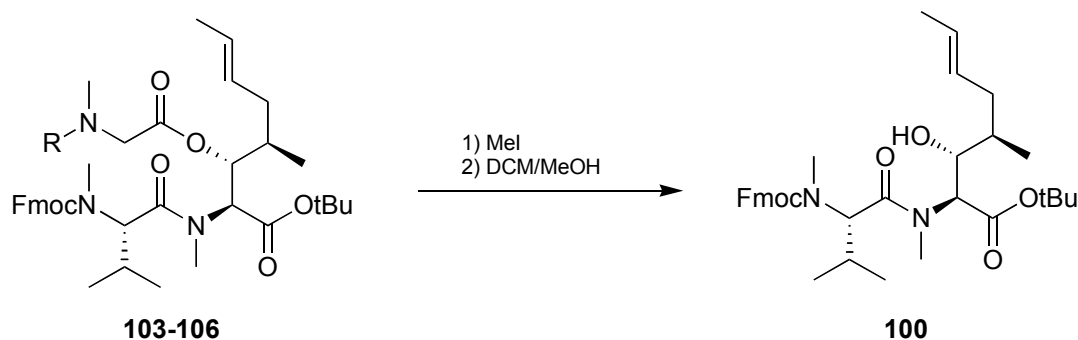


Laternentyp	R	Grundbeladung	Beladung
I	 76	36.7 μmol	7.9 μmol (22%) 102
II	 77	37.0 μmol	28.6 μmol (77%) 103
III	 78	35.4 μmol	29.2 μmol (82%) 104
IV	 79	35.2 μmol	30.7 μmol (87%) 105
V	 81	37.0 μmol	34.0 μmol (92%) 106

Tabelle 12 Beladungswerte der Laternen Typ I-V **102-106**

5.1.5.2 Abspaltung von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu

Die im Kapitel 5.1.5.1 mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu beladenen Laternen des Typs II-V (**103-106**) wurden mit Methyljodid aktiviert und anschliessend mit einer Lösung aus DCM/MeOH versetzt. Die Spallösungen wurden mittels HPLC analysiert und der Gehalt an Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu (**100**) über die ermittelten Peakflächen mit Hilfe von internen Standards quantifiziert. Die erreichten Abspaltungsausbeuten sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Laternen des Typs I (Standard ohne Spacer, **102**) wurden aufgrund ihrer sehr tiefen Beladung nicht untersucht.



Laternentyp	R	Reaktionszeit	Ausbeute
Typ II 103		24 h	69%
Typ III 104		24 h	93%
Typ IV 105		24 h	96%
Typ V 106		24 h	90%

Tabelle 13 Ergebnisse der Abspaltungen von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu (**100**)

5.1.5.3 Abspaltung von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu

Die nach der Abspaltung von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu gefundenen Abspaltungsausbeuten wurden durch ein weiteres Abspaltungsexperiment überprüft. Die im Kapitel 5.1.5.1 mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu beladenen Laternen des Typs II-V (**103-106**) wurden nach der Beladungsbestimmung mittels Fmoc-Abspaltung und Quantifizierung mit Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert. Anschliessend wurden die Laternen mit MeI aktiviert und danach mit einer Lösung aus DCM/MeOH versetzt. Die Spatlösungen wurden mittels HPLC analysiert und der Gehalt an Ac-MeVal-MeBmt-OtBu (**95**) über die ermittelten Peakflächen mit Hilfe von internen Standards quantifiziert. Die erreichten Abspaltungsausbeuten sind in der

folgenden Tabelle dargestellt. Laternen des Typs I (Standard ohne Spacer, **102**) wurden aufgrund ihrer sehr tiefen Beladung nicht untersucht.



Laternentyp	R	Reaktionszeit	Ausbeute
Typ II 103		24 h	72%
Typ III 104		24 h	99%
Typ IV 105		24 h	97%
Typ V 106		24 h	74%

Tabelle 14 Ergebnisse der Abspaltungen von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu (**95**)

5.1.6 Zusammenfassung

Die Kupplung der ersten Aminosäure (MeVal) an MeBmt bereitete die erwarteten Probleme. Eine direkte Kupplung konnte nur mit sehr tiefen Ausbeuten durchgeführt werden. Die Modifikation der Synthesestrategie, in der für den ersten Kupplungsschritt MeVal durch Val ersetzt wurde, führte zu einer deutlich höheren Ausbeute an Dipeptid **91**. Die nachfolgende direkt an der Festphase durchgeführte N-Methylierung lieferte jedoch nicht das erhoffte Resultat. Zwar wurde das gewünschte N-methylierte Derivat **94** synthetisiert, jedoch gleichzeitig durch die

verwendeten Reaktionsbedingungen eine Aktivierung und eine nachfolgende Spaltung des Linkers hervorgerufen. Erst die Synthese des Dipeptids Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu (**100**) in Lösung und die anschliessende Beladung der Laternen mit diesem Dipeptid löste das Kupplungsproblem. Durch die Verwendung des Dipeptids für die Grundbeladung der Festphase wurde gleichzeitig ein Derivat gefunden, welches den postulierten O-N-Acylshift unterdrücken sollte.

Die Beladungs- und Abspaltungsexperimente unter Verwendung des in Lösung synthetisierten Dipeptids bestätigten die bereits mit Boc- oder Fmoc-MeBmt-OtBu gefundenen Resultate, lieferten jedoch gleichzeitig auch die neuen Erkenntnisse, dass der verwendete Spacer einen sehr grossen Einfluss, sowohl auf die erreichbaren Beladungswerte, als auch auf die Abspaltungsausbeuten hat.

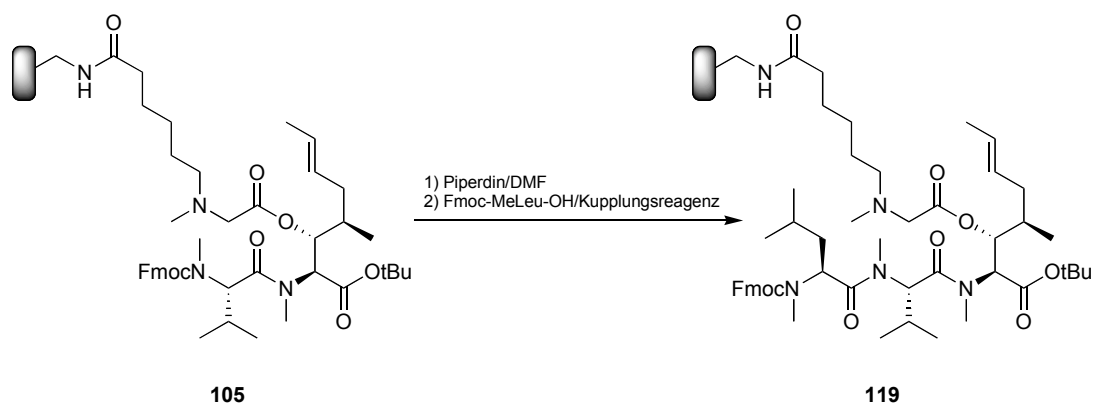
Ein Doppelspacer, hergestellt aus zwei Sarcosin-Einheiten (Laternen Typ V), lieferte dabei die höchsten Beladungswerte. Der Unterschied zwischen einem Buttersäure- oder Capronsäurespacer (Typ III und IV) fiel nur gering aus. Eine direkte Beladung der Laternen ohne Verwendung von Spacern erfolgte nur in tiefer Ausbeute. Bei der Abspaltung des Dipeptids durch Aktivierung des Linkers und anschliessender Spaltung wurden unter Verwendung des Buttersäure- und des Capronsäure-Spacers die besten Ergebnisse erreicht. Die durchgeführten Experimente lieferten die Grundlage für den nachfolgenden Aufbau der linearen Peptidkette.

Eine Stabilitätsuntersuchung des Linkersystems zeigte, dass das Linkersystem gegenüber den in der Synthese verwendeten Basen (DIEA, DMAP und Piperidin) stabil ist.

5.2 Festphasensynthese des Hexapeptids

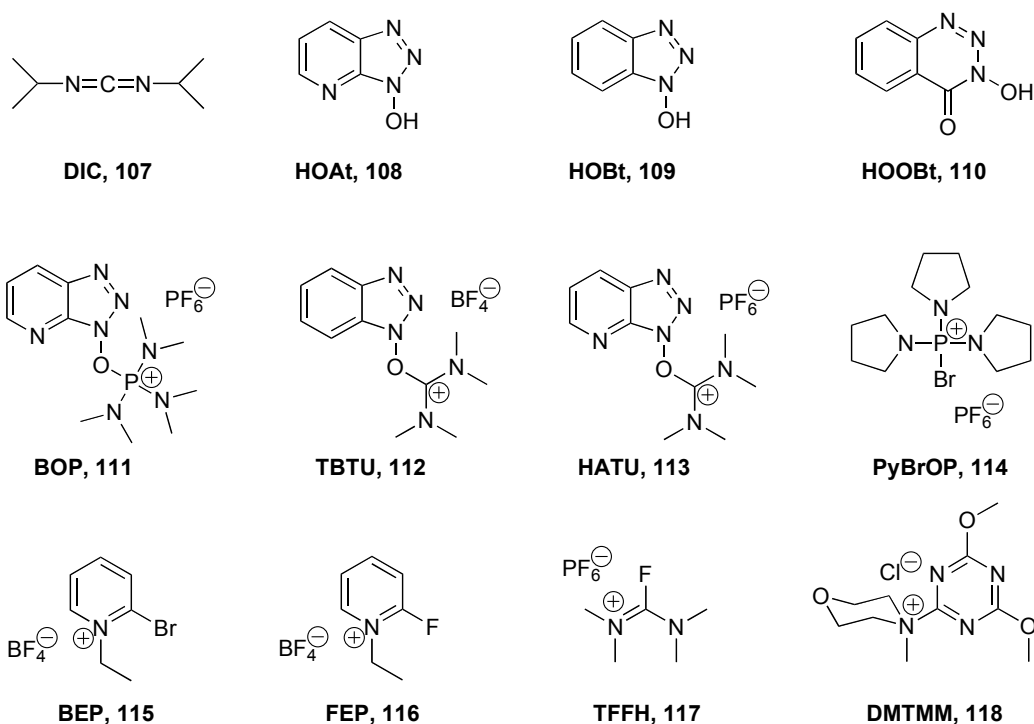
5.2.1 Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH

Aufgrund der Erfahrungen aus der Kupplung von MeVal an MeBmt wurde für die ebenfalls als sehr schwierig einzustufende Kupplung von MeLeu auf MeVal ein Kupplungsscreening durchgeführt. Festphasenlaternen (Typ IV, **105**) beladen mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu wurden für die Testkupplungen eingesetzt.



Schema 26 Kupplungsscreening vom Dipeptid **105** zum Tripeptid **119**

In einem ersten Schritt wurden viele gängige Kupplungsreagenzien und Zusätze für Kupplungen (*Schema 26*) auf ihre Verwendbarkeit für diese sehr schwierige Kupplung an der Festphase getestet.



Schema 27 Kupplungsreagenzien und Zusätze **107-118**

Die eingesetzten Kupplungsreagenzien und Zusätze wurden bereits für Festphasensynthesen eingesetzt oder aber speziell für schwierige Kupplungen

entwickelt. Die in der Testkupplung erreichten Ausbeuten sind in *Abbildung 28* grafisch dargestellt.

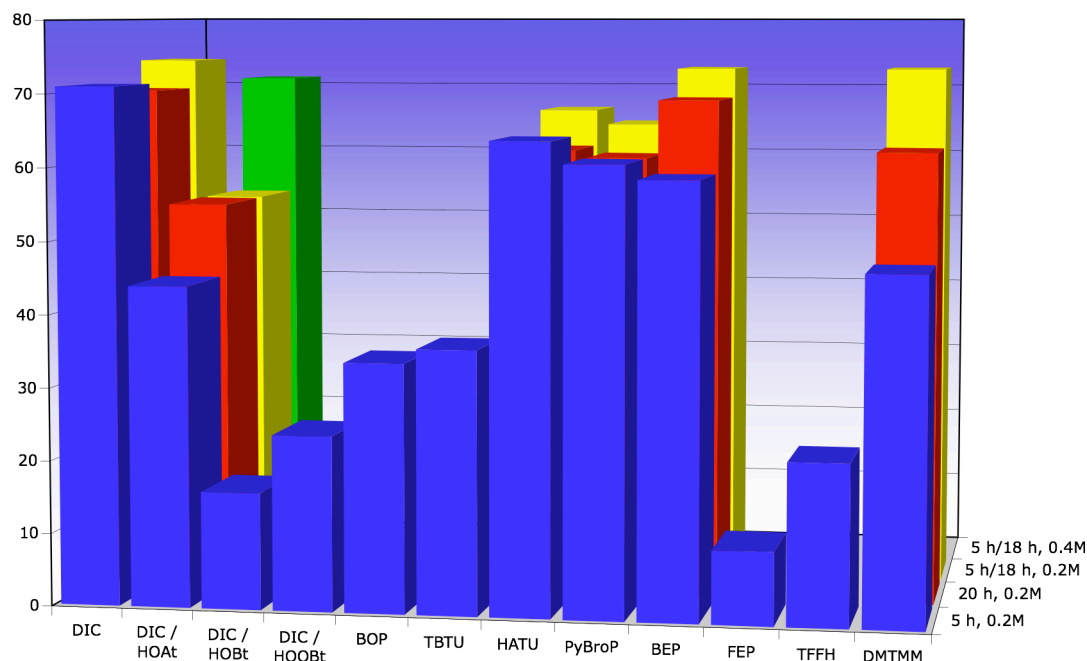


Abbildung 27 Kupplungsausbeuten der verwendeten Kupplungsreagenzien und Zusätze

Das Diagramm zeigt die erreichten Kupplungsausbeuten unter Verwendung verschiedener Kupplungsdauern und Konzentrationen der Kupplungslösungen. Es wurde mit einem 10-fachen Überschuss an Fmoc-MeLeu-OH in Bezug auf die Beladung der verwendeten Festphasenlaternen vom Typ IV (Capronsäure Spacer, **105**) gearbeitet. Aufgrund der Resultate schieden verschiedene Kupplungsreagenzien direkt, ohne weitere Optimierung der Kupplungsbedingungen aus. Zu diesen gehörten FEP (**116**)¹¹⁵ und TFFH (**117**)¹¹⁶, welche eine Aktivierung über das entsprechende Säurefluorid der Aminosäure generieren. Obwohl mit DIC (**107**)¹¹⁷ eine sehr hohe Kupplungsausbeute erreicht werden konnte, wurde dieses Reagens später nicht ohne Zusatz von HOBt (**109**) oder HOAt (**108**) verwendet, da ansonsten ein sehr hoher Grad an Epimerisierung von Fmoc-MeLeu-OH erwartet wird.

Schlechte bis mässige Resultate lieferten Reagenzien und Zusätze, welche die Säurefunktion zu einem –OBt-Aktivester umwandeln (DIC/HOBt (**107/109**), TBTU (**112**)^{118, 119}). Deutlich überlegen gegenüber dieser Aktivierungsmethode zeigten sich

die entsprechenden Reagenzien und Zusätze die einen –OAt-Aktivester generieren (DIC/HOAt (**107/108**)^{117, 120}, HATU (**113**)^{113, 121, 122}). Des weiteren wurden speziellere Reagenzien wie BOP (**111**)^{39, 123}, PyBroP (**114**)^{124, 125}, DIC/HOObt (**107/110**)^{126, 127} und DMTMM (**118**)¹²⁸ getestet, die teilweise sehr gute Kupplungsergebnisse lieferten. Die besten Resultate wurden unter Verwendung von BEP (**115**)^{88, 115} und einer Doppelbeladung (5 Stunden und 18 Stunden) erreicht. Dieses Reagenz wurde für die Synthese von Cyclosporin-Derivaten in Lösung entwickelt und zeichnet sich insbesondere bei der Herstellung des Tetrapeptids Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OH durch sehr hohe Kupplungsausbeuten aus.

5.2.2 Festphasensynthese des Hexapeptids Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (122)

5.2.2.1 Aufbau des Hexapeptids unter Verwendung von BEP als Kupplungsreagens

Aufgrund der im Kupplungsreagenzscreening gefundenen Resultate wurde unter Verwendung von BEP (**115**) als Kupplungsreagenz das Hexapeptid **122** an den Festphasenlaternen (Typ IV Capronsäure-Spacer, **105**) aufgebaut. Sämtliche Kupplungen wurden in einem Doppelbeladungsverfahren (jeweils 5 Stunden und 18 Stunden) durchgeführt. Nach den Kupplungen wurden die nicht abreagierten Aminofunktionen der Aminosäuren mit Essigsäureanhydrid acetyliert, um damit die Bildung von ähnlichen Fehlsequenzen zu unterbinden. Anschliessend wurde auf jeder Stufe, ausser der Schlussstufe, durch Fmoc-Abspaltung und Quantifizierung die Kupplungsausbeute bestimmt, und eine Probespaltung zur Bestimmung der Abspaltungsausbeute (berechnet über die theoretischen Mengen der richtigen Sequenzen und acetylierten verkürzten Sequenzen) durchgeführt. Die gefundenen Resultate sind in der nachfolgenden *Tabelle 15* dargestellt.

Peptidsequenz	Kupplungsausbeute	Spaltausbeute
Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 119	69%	82%
Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 120	45%	75%
Fmoc-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 121	92%	49%
Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 122	nicht bestimmt	51%

Tabelle 15 Kupplungs- und Spaltausbeuten beim Aufbau des Hexapeptids 122 mit BEP; Kupplungen jeweils mit 0.2 M Lösung an AS/BEP/DIPEA

Die Synthese des Hexapeptids **122** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die nach der jeweiligen Abspaltung isolierten Produkte wurden durch ESI-MS auf die vorhandenen Massen untersucht. Dabei konnten auf jeder Stufe der Synthese die erwarteten Bausteine identifiziert werden. Es zeigten sich jedoch zwei neue Probleme: Einerseits konnte die Kupplung zwischen MeLeu und MeLeu zum Aufbau des Tetrapeptids nur in mässiger Ausbeute durchgeführt werden; andererseits trat im Vergleich zur Spaltung der Tri- und Tetrapeptide, ab der Spaltung des Pentapeptids eine merkliche Verminderung der Spaltausbeute ein.

Aufgrund der schlechten Ausbeuten wurde die Kupplung von MeLeu auf MeLeu einer genaueren Betrachtung unterzogen. Ein erneutes Kupplungsreagenzienscreening zeigte, dass eine Erhöhung der Konzentration der Kupplungslösungen zu einer höheren Ausbeute an gewünschtem Produkt führte. Die Kombination von DIC (**107**) mit HOAt (**108**) lieferte dabei unter den getesteten Kupplungsreagenzien und Zusätzen die besten Ausbeuten. Die Abnahme der Spaltausbeuten wurde jedoch auf dieser Stufe der Synthese weder näher untersucht, noch optimiert.

5.2.2.2 Aufbau des Hexapeptids unter Verwendung von DIC/HOAt als Kupplungsreagenz

Die verbesserten Kupplungsbedingungen wurden in einem alternativen Syntheseweg zum Hexapeptid **122** getestet. Gleichzeitig wurden dabei zwei verschiedene Spacertypen (Typ IV Capronsäurespacer, **105** und Typ V Sarcosin-Sarcosin-Spacer, **106**) verwendet. Diese unterschiedlichen Spacer sollten eine Aussage betreffend ihres Einflusses auf die Kupplungsausbeuten ermöglichen. Die gefundenen Resultate sind in der nachfolgenden *Tabelle 16* dargestellt.

Peptidsequenz	Kupplungsausbeuten	
	Laternen Typ IV	Laternen Typ V
Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 119	65%	61%
Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 120	78%	68%
Fmoc-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 121	81%	64%
Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 122	87%	96%

Tabelle 16 Kupplungsausbeuten beim Aufbau des Hexapeptids 122 mit DIC/HOAt; Kupplungen jeweils mit 0.4 M Lösung an AS/DIC/HOAt/DIEA

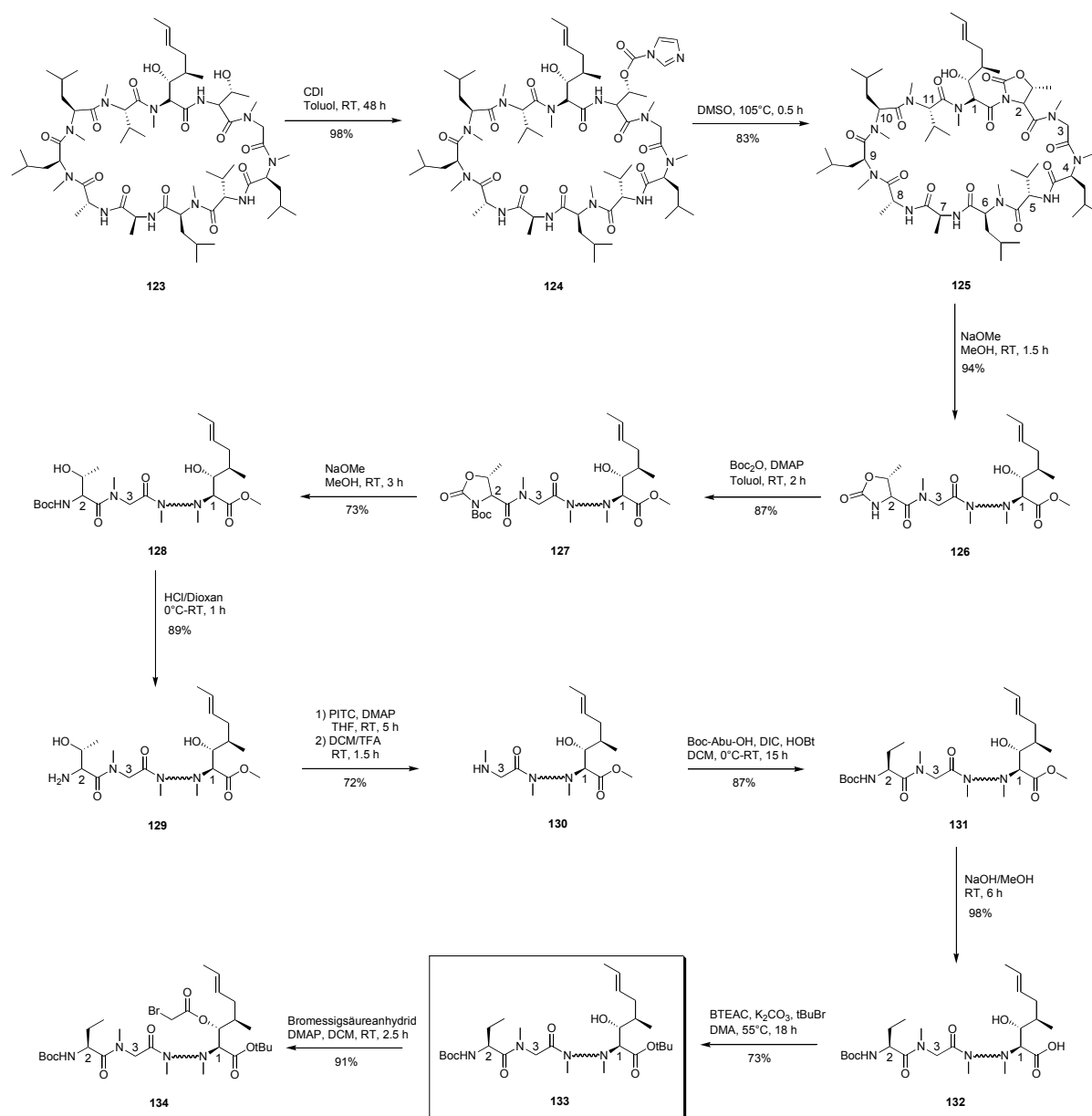
Die Ausbeute bei der Herstellung des Hexapeptids **122** konnte durch den Einsatz von DIC/HOAt (**107/108**) als Kupplungsreagenz und durch die Verwendung von höheren Konzentrationen der Kupplungslösungen stark verbessert werden. Der Aufbau des Hexapeptids mit DIC/HOAt lieferte für beide Spacertypen zum Teil ähnliche Kupplungsausbeuten. Dennoch scheint der Capronsäure-Spacer dem Sarcosin-Sarcosin-Spacer vor allem bei den Kupplungen von MeLeu auf MeLeu und von Ala auf MeLeu überlegen zu sein.

5.3 Synthese des Undecapeptids

Festphasensynthesen von verschiedenen linearen CsA Vorläufern und Derivaten wurden schon von verschiedenen Gruppen durchgeführt (*Kapitel 1.2.4.1 und 1.2.4.2*).^{82, 83, 85, 87, 129} Meist wurde die C-terminale Säurefunktion der ersten Aminosäure an die Festphase gebunden und anschliessend das lineare Peptid durch klassische Festphasensynthese aufgebaut. Bis anhin wurde jedoch noch keine Festphasensynthese durchgeführt, bei der die Seitenkette von MeBmt an die Festphase gebunden wurde. Um das an der Festphase zu synthetisierende Undecapeptid eindeutig identifizieren und charakterisieren zu können, wurde mittels Lösungssynthese eine entsprechende Referenzverbindung **133** hergestellt. Diese wurde später ebenfalls dazu verwendet, sowohl die Spaltungsbedingungen von der Festphase, als auch die Cyclisierungsbedingungen an der Festphase zu untersuchen.

5.3.1 Synthese des linearen Undecapeptids Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (133) in Lösung

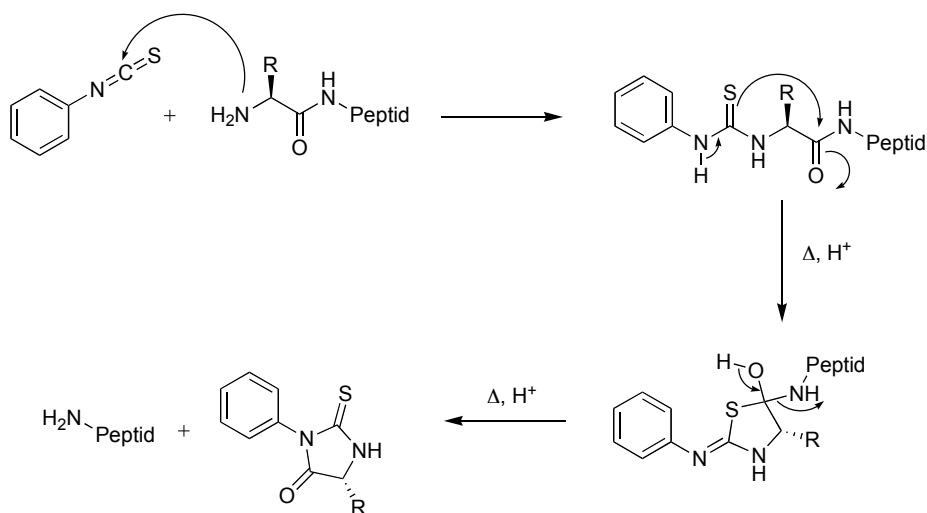
Die Synthese des linearen Undecapeptids **133** wurde nach dem im *Schema 27* aufgezeigten Verfahren durchgeführt.



Schema 28

Synthese des linearen Undecapeptids **133** als Vorläufer für die Festphasensynthese

Als Ausgangsmaterial für die Synthese des linearen Undecapeptids von CsA **133** wurde CsC (**123**) verwendet. Dieses Analogon unterscheidet sich nur in einer Aminosäure von der Peptidkette des CsA (in Position 2 Thr statt Abu). In einem ersten Schritt erfolgte die Umsetzung der Hydroxyfunktion der Seitenkette von Thr² mit Carbonyldiimidazol zum entsprechend aktivierten Derivat **124**. Dieses aktivierte Zwischenprodukt bildete in DMSO bei 105°C das cyclische Zwischenprodukt **125**. Durch Behandlung mit Natriummethanolat konnte anschliessend die Peptidkette des cyclischen Peptids zwischen den Aminosäuren 1 (MeBmt) und 2 (derivatisiertes Thr) zum linearen Undecapeptid **126** aufgebrochen werden. Nach der Einführung der Boc-Schutzgruppe am Aminoende des modifizierten Thr² und dem Bruch des Rings erhielt man in sehr guter Ausbeute das lineare Undecapeptid **128** von CsC. Dieses konnte nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe durch klassischen Edman-Abbau^{130, 131} (*Schema 29*) mit Phenylisothiocyanat und anschliessender saurer Behandlung in das um eine Aminosäureeinheit verkürzte Decapeptid **130** umgewandelt werden.



Schema 29 Edman-Abbau

Nach der Peptidkupplung des Decapeptids **130** mit Boc-Abu-OH (Aktivierung mit Diisopropylcarbodiimid und Hydroxybenzotriazol) erhielt man das lineare Undecapeptid **131** von CsA. Der C-terminale Methylester wurde mit Natronlauge in Methanol verseift und die Carbonsäure **132** unter den gleichen Bedingungen wie bei der Herstellung von Boc-MeBmt-OtBu in den entsprechenden t-Butylester **133** umgewandelt. Dieses Undecapeptid wurde als Referenzsubstanz für die

Identifizierung des an der Festphase aufgebauten Undecapeptids hergestellt. Gleichzeitig erhielt man daraus nach der Reaktion mit Bromessigsäureanhydrid den entsprechenden linearen Vorläufer **134** für die Kupplung an die Festphase, um Untersuchungen für geeignete Cyclisierungsbedingungen durchzuführen.

Über die hier dargestellte Reaktionssequenz konnte ausgehend von CsC in 11 Stufen der gewünschte lineare Vorläufer **134** für die Untersuchung der Cyclisierungsbedingungen in einer Gesamtausbeute von 18% synthetisiert werden.

5.3.2 Synthese des linearen Undecapeptids Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (133) an der Festphase

Ausgehend von den beschriebenen Experimenten zur Optimierung der Grundbeladung der Laternen, der Kupplungsbedingungen für die schwierigen Kupplungsschritte und der zu verwendenden Spacer auf den Festphasen-Laternen wurde die Synthese des Undecapeptids **134** an der Festphase durchgeführt. In *Tabelle 17* sind die erhaltenen Kupplungsaubeuten (bestimmt über Quantifizierung der Fmoc-Spaltlösungen) dargestellt. Die bereits bis zum Hexapeptid durchgeführten Synthesen an Typ IV und Typ V Laternen wurden bis zum Undecapeptid weitergeführt.

AS	Peptidsequenz	Beladung (Kupplungsausbeuten)	
		Laternen Typ IV 105	Laternen Typ V 106
2	Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu 101	30.7 μmol	34.0 μmol
3	Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 120	20.0 μmol (65%)	20.8 μmol (61%)
4	Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 121	15.5 μmol (78%)	14.0 μmol (68%)
5	Fmoc-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 122	12.5 μmol (81%)	9.00 μmol (64%)
6	Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 123	10.9 μmol (87%)	8.62 μmol (96%)
7	Fmoc-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 135	10.6 μmol (97%)	7.84 μmol (91%)
8	Fmoc-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 136	9.28 μmol (88%)	7.05 μmol (90%)
9	Fmoc-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 137	9.28 μmol (100%)	7.05 μmol (100%)
10	Fmoc-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 138	8.61 μmol (93%)	7.05 μmol (100%)
11	Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 133	nicht bestimmt	nicht bestimmt
	Gesamtausbeute	28%	21%

Kupplungen jeweils mittels Doppelbeladung mit AS/DIC/HOAt 0.4 M Lösung

Tabelle 17 Zusammenfassung der Synthese des Undecapeptids **133**

Die Verwendung von Laternen des Typs IV führte zu einer höheren Gesamtausbeute gegenüber der Verwendung von Laternen des Typs V aufgrund der höheren Kupplungsausbeuten bei den schwierigen Kupplungsstellen bis zum Hexapeptid. Die restliche Festphasensynthese gelingt an den Laternen des Typs V analog zu denen des Typs IV.

Nach der Schlussstufe erfolgte die Abspaltung des synthetisierten Undecapeptids. Die Identität des abgespaltenen Produkts wurde mittels ESI-MS (Molekülmasse) und mittels HPLC (Koelution) mit der im *Kapitel 5.3.1* beschriebenen Referenzsubstanz (Undecapeptid, **133**) bestätigt.

5.4 Cyclisierung der linearen Vorläufer

Die Cyclisierung von linearen Peptiden ist mitunter einer der schwierigsten Syntheseschritte auf dem Weg zum gewünschten Endprodukt. Dabei haben die folgenden Faktoren oft einen entscheidenden Einfluss auf das Gelingen des Cyclisierungsschrittes:

- die an der Cyclisierung beteiligten Kupplungspartner, beziehungsweise der Ort, an dem die Peptidkette geschlossen wird,
- die verwendete Aktivierungsmethode,
- die verwendete Verdünnung der Reaktionslösung, die eine intra- oder intermolekulare Reaktion unterstützt.

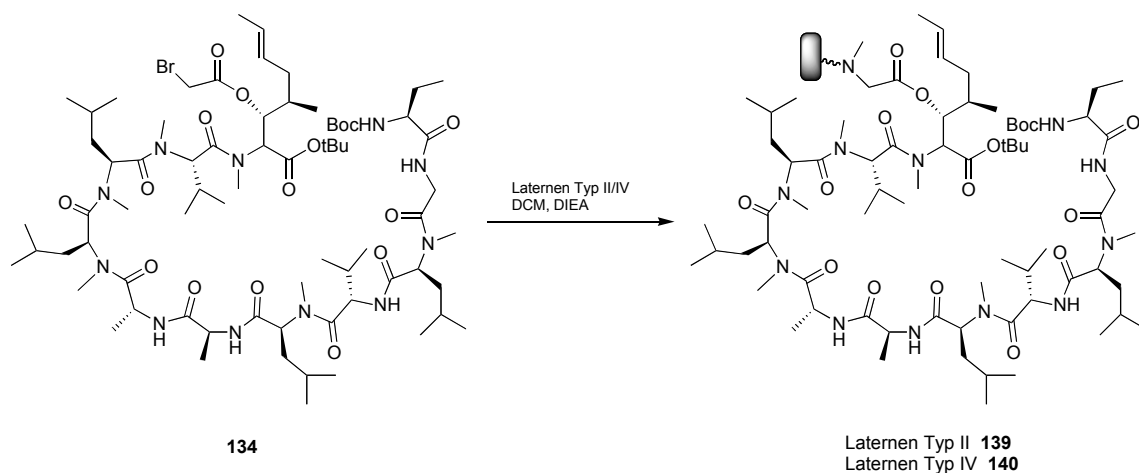
Die Cyclisierung von linearen Peptidketten zu Cyclosporinen widerspiegelt diese Problemfaktoren und zeigt, wie diese Faktoren die Syntheseplanung beeinflussen können. Die Probleme der Cyclisierung in Lösung lassen sich dabei nahezu unverändert auf die Cyclisierung an der Festphase übertragen. Die Grundbeladung der Laternen definiert bereits zu Beginn der Synthese die spätere „Verdünnung“ für den Cyclisierungsschritt.^{82, 84, 85, 129}

Der in Lösung hergestellte lineare Vorläufer von Cyclosporin A **134** (*Kapitel 5.3.1*) wurde genutzt, um die Cyclisierungs- und Abspaltungsbedingungen zu optimieren.

5.4.1 Cyclisierung der Modellverbindung

5.4.1.1 Beladung der Festphasenlaternen mit Undecapeptid 134

Der ausgehend von CsC synthetisierte und mit dem Linker modifizierte lineare Vorläufer von CsA **134** konnte analog zu Boc-MeBmt-OtBu **60** und Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu **101** an die Festphase gekuppelt werden.

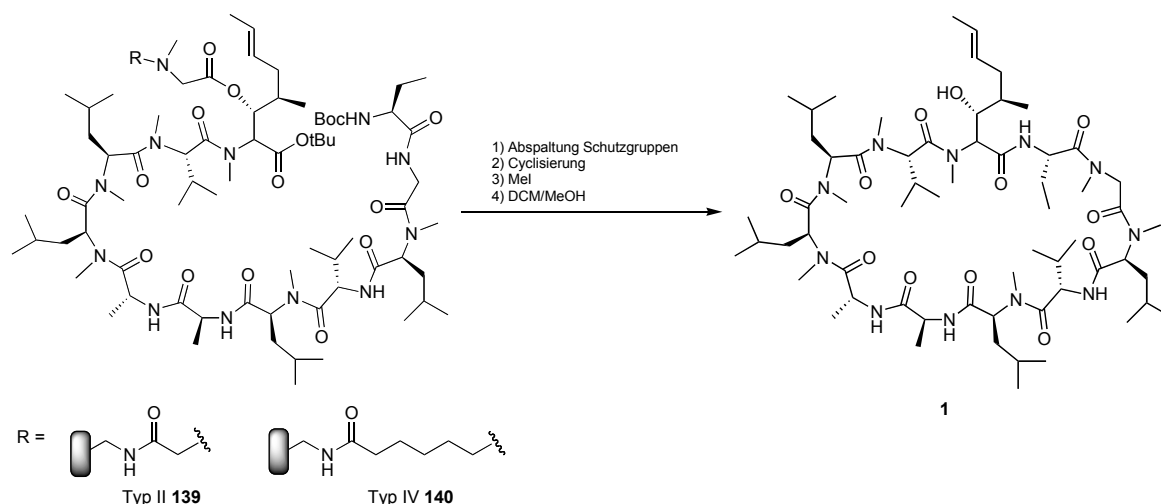


Schema 30 Beladung der Festphase mit Undecapeptid **134**

Aufgrund der Grösse und des resultierenden sterischen Anspruchs des Moleküls sind die Beladungswerte niedriger als bei den einzelnen Aminosäuren oder Dipeptiden. Dennoch wurden Beladungswerte in einer Grössenordnung (**139** 6.8 μmol , Ausbeute 18%; **140** 14.8 μmol , Ausbeute 42%) erhalten, die eine sinnvolle Auswertung der ersten Cyclisierungs- und Abspaltungsexperimente erlaubten, und gleichzeitig realistische Beladungen darstellten, wie sie später beim Aufbau des Peptids an Festphase erreicht wurden. Gleichzeitig zeigten die Beladungswerte den grossen Einfluss der verwendeten Spacer.

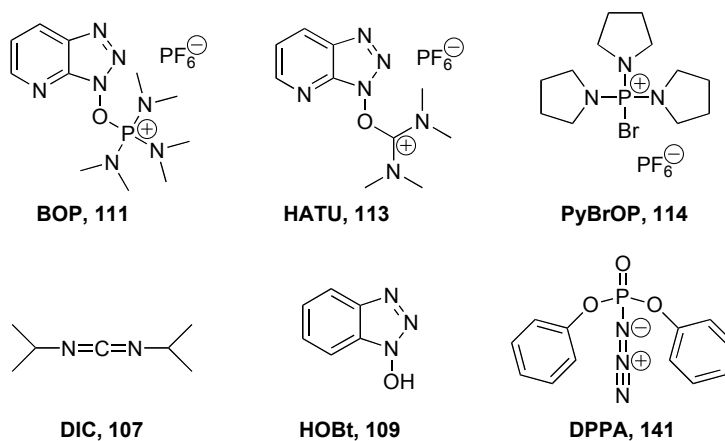
5.4.1.2 Optimierung der Abspaltungs- und Cyclisierungsbedingungen

Die Beladung der Festphasenlaternen mit dem in Lösung hergestellten linearen Vorläufer von CsA **134**, ermöglichte eine Optimierung der Abspaltungsbedingungen für die Schutzgruppen an den endständigen Amino- und Säurefunktionen des Peptids, und der anschliessenden Cyclisierungsbedingungen. Aufgrund der in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Instabilität des Linkers gegenüber stark sauren Bedingungen war die Optimierung der Spaltlösung zur Abspaltung der Schutzgruppen von grosser Bedeutung. Die in der Literatur zum Ringschluss von Cyclosporinderivaten häufig verwendeten Kupplungsreagenzien wurden parallel ebenfalls einem Vergleich unterzogen. Die durchgeführten Experimente sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.



Exp.	Laterne	Abspaltung der Schutzgruppen		Cyclisierung		Ausbeute
		Lösung	Dauer	Lösung	Dauer	
I	Typ IV	TFA / DCM (1:1)	4 h	DIC / HOBt 0.2 M, DCM	48 h	5%
II	Typ IV	TFA / DCM (1:1)	4 h	BOP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	7%
III	Typ IV	TFA / DCM (1:1)	4 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	10%
IV	Typ IV	TFA / DCM (1:3)	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	10%
V	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	7%
VI	Typ IV	TFA / DCM (1:10)	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	6%
VII	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	8%
VIII	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	1 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	11%
IX	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	10%
X	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	1 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	8%
XI	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	10%
XII	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	3 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	11%
XIII	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	9 h	7%
XIV	Typ IV	TsOH 0.2 M, DCM / THF	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	9 h	6%
XV	Typ II	TsOH 0.2 M, DCM / THF	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	9 h	6%
XVI	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	24 h	12%
XVII	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	BOP / DIEA 0.2 M, DCM	24 h	8%
XVIII	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	HATU / DIEA 0.2 M, DMF	24 h	1%
XIX	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	DPPA / DIEA 0.2 M, DMF	24 h	2%

Tabelle 18 Optimierung der Spaltlösung und des Cyclisierungsreagens



Schema 31 Verwendete Kupplungsreagenzien für die Cyclisierung

Die Durchführung der Experimente erfolgte unter Verwendung von Laternen des Typs II **139** und des Typs IV **140**. Die Abspaltung der synthetisierten Verbindungen erfolgte jeweils unter den im *Kapitel 4.7* definierten Bedingungen (Aktivierung mit Methyljodid und anschließender Abspaltung in einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch 3:1). Die Spallösungen wurden mittels HPLC analysiert und über Flächenfaktoren durch Zugabe von CsC als internem Standard quantifiziert. Einzelne HPLC-Peaks wurden isoliert und mittels ESI-MS charakterisiert. Zur Beschreibung der Experimente und zur Abgrenzung der variierten Parameter können die in der Tabelle dargestellten Experimente in verschiedene Gruppen unterteilt werden:

Gruppe 1 (Experimente I-III)

In dieser Versuchsreihe wurde unter gleichen Spaltbedingungen zur Spaltung der Schutzgruppen unterschiedliche Cyclisierungs- oder Kupplungsreagenzien für den Ringschluss getestet. DIC/HOBt (**107/109**) gelangte bereits bei der Festphasensynthese zum Einsatz, BOP (**111**) und PyBroP (**114**) sind Kupplungsreagenzien, die bereits für Cyclisierungsreaktionen von Cyclosporinen in Lösungssynthesen verwendet wurden. Die Versuchsreihe zeigte deutlich, dass eine Cyclisierung des linearen Vorläufers von CsA **139/140** an der Festphase möglich ist. Sämtliche verwendeten Cyclisierungsreagenzien führten zu einem positiven Resultat, das heisst sie lieferten die gewünschte Verbindung CsA (**1**), wobei die beste Ausbeute dieser ersten Untersuchungsgruppe mit PyBroP erreicht wurde.

Gruppe 2 (Experiment IV)

Dieses Experiment diente zur Bestätigung der in der ersten Gruppe erreichten positiven Resultate. Die Spallösung wurde in diesem Experiment modifiziert und gleichzeitig die Reaktionsdauer zur Spaltung der Schutzgruppen reduziert. Die Ausbeute des Experimentes III konnte dabei bestätigt, aber nicht übertroffen werden.

Gruppe 3 (Experimente V und VI)

In dieser Untersuchungsgruppe wurden zwei Experimente durchgeführt, um den Einfluss von Triethylsilan auf den Abspaltungsschritt zu untersuchen. In der Literatur

wird auf den Einfluss dieses Scavengers bei Spaltungen unter Verwendung von TFA hingewiesen.^{132, 133} Es konnte im Vergleich zum Experiment VI (ohne Zugabe von Triethylsilan) im Experiment V (mit Zugabe von Triethylsilan) jedoch keine wesentlich höhere Ausbeute erzielt werden.

Gruppe 4 (Experimente VII-XIII)

In dieser Gruppe wurde der Einfluss der Spaltdauer und der Konzentration der Spaltlösung auf die Ausbeute untersucht. Die Experimente führten in allen Fällen zu ähnlichen Ergebnissen. Es scheint aber, dass die Spaltdauer und die Konzentration der Spaltlösung einen Einfluss auf die Ausbeute ausüben. Je länger die Spaltdauer, desto grösser scheint die Gefahr einer gleichzeitig stattfindenden Spaltung des Linkers unter Verlust des Moleküls in der Spaltlösung (*Kapitel 5.1.3*). Dies zeigt sich durch die abnehmenden Ausbeuten bei längerer Spaltdauer. Ist jedoch die Spaltdauer zu kurz, sinkt die Ausbeute ebenfalls ab, da in diesem Fall nur wenig des linearen Produktes vollständig geschützt zur Cyclisierungsreaktion vorliegt.

Ebenfalls in dieser Gruppe wurde der Einfluss der Reaktionszeit für den Cyclisierungsschritt durch ein Kontrollexperiment überprüft. Die Verkürzung der Reaktionszeit im Fall des Experimentes X führt im Vergleich zum Experiment mit längerer Cyclisierungszeit (IX) zu einer Minderausbeute.

Gruppe 5 (Experimente XIV und XV)

Alternativ zu dem verwendeten Abspaltungsgemisch TFA/DCM wurde in dieser Gruppe mit Toluolsulfonsäure als Spaltreagenz gearbeitet.¹³⁴ Die Änderung der Spaltlösung wurde parallel an Laternen des Typs II und IV getestet, um gleichzeitig auch den Einfluss des verwendeten Spacersystems zu untersuchen. Die erhaltenen Ausbeuten lagen deutlich unter den bereits erreichten Werten mit der TFA/DCM Spaltlösung. Nach Abspaltung von der Festphase konnte in der Spaltlösung mittels HPLC und ESI-MS ein grosser Anteil an vollständig geschütztem linearen Undecapeptid nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die verwendeten Bedingungen das an der Festphase gebundene Peptid nur unvollständig entschützen konnte. Da die verwendeten unterschiedlichen Laternentypen zu identischen

Ausbeuten führten, scheint ein Einfluss des Spacers auf die Spaltung der Schutzgruppen und die anschließende Cyclisierung nicht messbar zu sein.

Gruppe 6 (Experimente XVI-XIX)

In dieser letzten Untersuchungsgruppe wurden unter Verwendung von Laternen des Typs II, konzentrierteren Spalllösungen und kürzerer Spaltdauer noch einmal verschiedene Kupplungsreagenzien zur Cyclisierung eingesetzt. Das beste Ergebnis wurde erneut bei der Verwendung von PyBroP (**114**) erreicht, während beim Gebrauch von HATU (**113**) und DPPA (**141**) praktisch kein CsA im HPLC-Chromatogramm nachgewiesen werden konnte.^{135, 136}

Zusammenfassung und Erkenntnisse aus den Optimierungs-experimenten zur Abspaltung der Schutzgruppen und Cyclisierung zum Endprodukt

Die wichtigste Erkenntnis aus den durchgeführten Experimenten ist die Tatsache, dass das postulierte Synthesesystem zur Herstellung von CsA (**1**) an der Festphase funktioniert. Dies wurde durch den Nachweis von CsA in den entsprechenden Spalllösungen mittels HPLC und MS bewiesen. Bestätigt wurde auch die Tatsache, dass im verwendeten System nur eine Pseudoorthogonalität zwischen den verwendeten Schutzgruppen des linearen Undecapeptids (Boc, tBu) und dem Linkergerüst besteht. Dies konnte durch Variation der Spaltzeiten und Analyse der Substanzgemische nach Abspaltung vom Harz untersucht werden. Eine zu kurze Spaltzeit führte zu einer unvollständigen Abspaltung der Schutzgruppen, eine zu lange Spaltzeit resultierte in einer gleichzeitigen Abspaltung des linearen Undecapeptids.

Die erreichten Ausbeuten an CsA lagen im Bereich von ungefähr 10%. Diese Resultate widerspiegeln die schwierigen Reaktionsstufen zum Abschluss der Synthese. Ausgehend von den durchgeführten Experimenten lässt sich keine abschliessende, isolierte Beurteilung der einzelnen Einflüsse (Festphase, Verdünnung, Cyclisierung, Orthogonalität etc.) auf diese Syntheseschritte durchführen.

Die besten Cyclisierungsausbeuten wurden mit PyBroP als Kupplungsreagenz erreicht. Deutlich tiefere Ausbeuten wurden mit Reagenzien erzielt, welche sehr

reaktive, jedoch zu wenig stabile, aktivierte Zwischenprodukte generieren (HATU, DIC/HOBt).

Die über die verschiedenen Festphasenlaternen Typ II und IV verwendeten Spacerdimensionen scheinen keinen signifikanten Einfluss auf den Cyclisierungsschritt auszuüben. Die erreichten Ausbeuten sind für beide Festphasentypen nahezu identisch.

5.5 Cyclisierung des an der Festphase synthetisierten Undecapeptids von CsA

Die Cyclisierung des an der Festphase synthetisierten Undecapeptids **133** (*Kapitel 5.3.2*) wurde mit den Parametern des Experimentes XVI (*Tabelle 18, Kapitel 5.4.1.2*) durchgeführt.

Nach der Abspaltung der Schutzgruppen am N- und C-Terminus mit einem Gemisch aus DCM/TFA (1:2) wurde das lineare Undecapeptid mit PyBroP/DIEA cyclisiert. Abschliessend wurden die an der Festphase gebildeten Substanzen mit MeI, DCM/MeOH abgespalten. Das Vorhandensein von CsA im erhaltenen Rückstand wurde erneut durch HPLC (Koelution mit Referenz) und ESI-MS (Molekülmasse) bestätigt.

Die Cyclisierung des CsA-Vorläufers gelang mit einer ähnlichen Ausbeute (Laterne Typ IV 9%, Laterne Typ V 8%), wie sie im Optimierungsexperiment für die Cyclisierung des in Lösung hergestellten Undecapeptids erreicht wurde (*Kapitel 5.4.2.1*).

6 Synthese von Cyclosporin A-Derivaten

Zur Überprüfung der durchgeführten Synthese von Cyclosporin A an der Festphase wurden Derivate mit unterschiedlichen Modifikationen der Peptidkette ausgewählt und ebenfalls an der Festphase aufgebaut, cyclisiert und freigesetzt.

6.1 Synthese der linearen Undecapeptide

Der Aufbau der linearen Undecapeptide wurde analog der Synthese der Peptidkette von CsA durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial wurden Laternen mit einem Capronsäurespacer (Laternen Typ IV) eingesetzt, mit dem Dipeptid (Fmoc-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu, **101**) beladen und die Undecapeptide mit den entsprechenden Aminosäuren und DIC/HOAt (Doppelbeladung) aufgebaut. Die erreichten Gesamtausbeuten der einzelnen Derivate sind in der folgenden Tabelle mit den Werten der CsA Synthesen verglichen. Die eingeführten Modifikationen sind mit der entsprechenden Position in der Peptidkette angegeben.

Derivat	Gesamtausbeute Peptidaufbau
CsA (Laterne Typ IV)	28%
CsA (Laterne Typ V)	21%
(Ala ² , D-MeAla ⁸) CsA	17%
(Val ² , D-MeAla ⁸ , Leu ¹⁰) CsA	17%
(Leu ⁶ , D-MeAla ⁸) CsA	25%
(Abu ⁷ , D-MeAla ⁸) CsA	25%
(MeIleu ⁴ , Leu ⁵ , D-MeAla ⁸ , Leu ¹⁰) CsA	24%

Tabelle 19 Gesamtausbeuten für den Aufbau der Peptidketten der CsA-Derivate

Nach dem Aufbau der Peptidkette wurden die Derivate analog dem linearen Undecapeptid von CsA von der Festphase freigesetzt (Aktivierung durch MeI, Freisetzung mit DCM/MeOH). Die Freisetzung konnte aufgrund fehlender Vergleichssubstanzen nicht quantifiziert werden. Die Identität der freigesetzten Substanzen wurde jedoch für alle hergestellten Derivate durch ESI-MS bestätigt.

6.2 Cyclisierung der an der Festphase synthetisierten Derivate

Die Cyclisierung der hergestellten Derivate wurde nach dem *Kapitel 5.5* durchgeführt. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen am N- und C-Terminus mit einem Gemisch aus DCM/TFA (1:2) wurden die linearen Undecapeptide mit PyBroP/DIEA cyclisiert. Abschliessend wurden die an der Festphase gebildeten Substanzen mit MeI und DCM/MeOH abgespalten.

Eine Quantifizierung der Cyclisierung und Freisetzung konnte aufgrund der fehlenden Vergleichssubstanzen auch hier nicht durchgeführt werden. Die Überprüfung der isolierten Rohprodukte durch ESI-MS zeigte für alle Derivate die gewünschten Massen, die auf eine erfolgreiche Cyclisierung hinweisen.

7 Zusammenfassung der Resultate

7.1 Linker/Spacer

Aufbauend auf bestehenden Arbeiten zur Synthese von Cyclosporin A und seiner Derivate wurde in der vorliegenden Dissertation nach einem Linkersystem gesucht, welches eine Totalsynthese von Cyclosporin A an der Festphase ermöglichen sollte. Durch die Immobilisierung der Seitenkette der Aminosäure 1 (MeBmt) an die Festphase wurde ein Weg gefunden, welcher es ebenfalls erlaubt den Cyclisierungsschritt an der Festphase durchzuführen. Erst im abschliessenden Schritt wird das Zielmolekül von der Festphase freigesetzt.

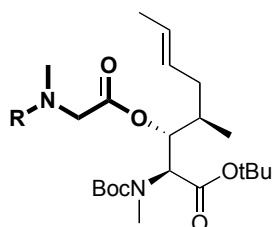


Abbildung 28 MeBmt über die Seitenkette verbunden mit der Festphase

Der Vorläufer **60** konnte in einer dreistufigen Synthese in einer Ausbeute von 60% hergestellt werden. Dieser wurde anschliessend zur Synthese der Modellverbindungen **63** und **69** genutzt, welche zur Untersuchung und Optimierung der Spaltbedingungen in der homogenen Phase benötigt wurden.

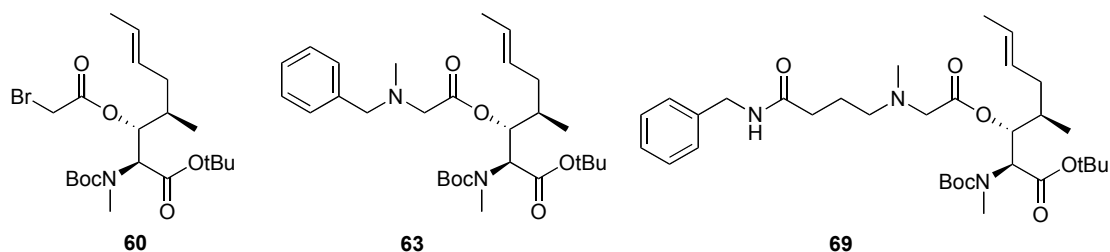


Abbildung 29 Vorläufer **60**, Modellverbindungen **63** und **69**

7.2 Aufbau des linearen Undecapeptids

Die erwartet schwierige Kupplung von Fmoc-MeVal¹¹-OH auf MeBmt¹ konnte zwar durchgeführt werden, dies jedoch nur mit geringen Ausbeuten. Als Alternative wurde eine Kupplung von Fmoc-Val-OH mit anschließender N-Methylierung am Harz ausgetestet. Diese führte erneut zur Bildung des gewünschten Dipeptids, wie der erste Weg konnte jedoch nur eine tiefe Ausbeute erzielt werden. Erst durch die Synthese des Dipeptids **101** in Lösung (5 Stufen, Ausbeute 40%) wurde ein Weg gefunden, welcher die beschriebenen Kupplungsprobleme überwand. Das Dipeptid wurde analog zu Fmoc- beziehungsweise Boc-MeBmt-OtBu auf der Festphase immobilisiert.

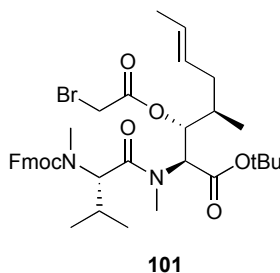


Abbildung 31 Vorläufer Fmoc-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (**101**)

Nach der Optimierung der folgenden Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH, lag mit DIC/HOAt ein Kupplungssystem vor, welches die Synthese des an die Festphase gebundenen linearen Undecapeptids **133** mit guten Ausbeuten ermöglichte. Durch die parallel in Lösung durchgeführte, 10-stufige Synthese dieser Verbindung konnte zur Identifikation des an der Festphase synthetisierten Materials Referenzmaterial hergestellt werden. Nach der Freisetzung des an der Festphase aufgebauten Peptids zeigte der Vergleich mittels HPLC (Koelution), DC und ESI-MS eindeutig, dass das an der Festphase hergestellte Peptid dem in Lösung synthetisierten Peptid entsprach.

7.3 Cyclisierung des linearen Undecapeptids

Das in Lösung hergestellte Undecapeptid **133** konnte analog der bereits hergestellten Aminosäuren und Dipeptide in der Seitenkette modifiziert und an die

Festphase gekuppelt werden. Die erhaltenen Derivate **139** (Laternen Typ II) und **140** (Laternen Typ IV) wurden zur Untersuchung und Optimierung der Abspaltungsbedingungen der Schutzgruppen (Boc-/OtBu) und der Cyclisierungsbedingungen an der Festphase genutzt. Es zeigte sich, dass Cyclosporin A ausgehend von dem an der Festphase immobilisierten linearen Undecapeptid, nach Spaltung der Schutzgruppen, Cyclisierung und Abspaltung von der Festphase, in Ausbeuten von grösser 10% erhalten werden konnte. Die besten Ausbeuten wurden mit DCM/TFA (Spaltung der Schutzgruppen) und PyBroP (Cyclisierungsreagens) erreicht. Die Übertragung der Reaktionsbedingungen auf die durch Peptidsynthese an der Festphase aufgebauten Undecapeptide gelang und lieferte Ausbeuten wie in den Optimierungsvorversuchen. Die erhaltenen Substanzen wurden analog zum linearen Undecapeptid nach der Freisetzung von der Festphase auf ihre Identität hin überprüft und eindeutig als Cyclosporin A identifiziert. Somit ist Cyclosporin A erstmals in einer Totalsynthese an der Festphase aufgebaut worden.

7.4 Synthese von Cyclosporin A-Derivaten

Der beschriebene Syntheseweg zum Aufbau des linearen Undecapeptids und der nachfolgenden Cyclisierung wurde genutzt, um Derivate von CsA an der Festphase zu synthetisieren. Aus einer von Herrn Dr. Wenger und Herrn Dr. Mattes (Novartis AG) zusammengestellten Bibliothek von Cyclosporinderivaten wurden einzelne Derivate ausgewählt, um die entwickelte Synthesemethode zu überprüfen.

Die linearen Peptidketten konnten mit ihren Modifikationen analog dem Undecapeptid von CsA an der Festphase (jeweils 2 Laternen pro Derivat) aufgebaut werden. Die erste der beiden Laternen wurde dazu genutzt, die Identität der Peptide durch Freisetzung vor der Cyclisierung durch ESI-MS zu überprüfen und zu bestätigen. Die zweite Laterne wurde genutzt, um die Cyclisierung und die anschliessende Freisetzung durchzuführen. Für alle hergestellten Derivate konnte die Identität durch erneute Bestimmung der Masse durch ESI-MS bestätigt werden.

Die durchgeführten Synthesen zeigten, dass die Synthesemethode zum Aufbau von CsA-Derivaten genutzt werden kann.

7.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Cyclosporin A und Derivate in einer Totalsynthese an der Festphase herstellen lassen.

Durch die Verwendung von Festphasenlaternen wurde ein Instrument eingesetzt, welches auch die einfache parallele Synthese von vielen Derivaten von Cyclosporin und damit den Aufbau einer grossen Substanzbibliothek ermöglicht.

Das eingesetzte Linkersystem verhält sich zu den eingesetzten Schutzgruppen nur pseudoorthogonal. Das heisst, der Aufbau der Peptidkette erfolgt durch die Verwendung der Fmoc-Aminosäuren (basische Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe) problemlos. Erst bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und des tButylesters des linearen Undecapeptids vor der Cyclisierung müssen Bedingungen verwendet werden, welche gleichzeitig auch eine partielle Spaltung des Linkersystems fördern. Die Schutzgruppenstrategie für die Synthese des Undecapeptids müsste deshalb optimiert werden. Die Boc-Schutzgruppe könnte problemlos durch die Fmoc-Schutzgruppe ersetzt werden. Eine Alternative für die Carboxylschutzgruppe (-OtBu) von MeBmt¹ müsste gesucht und auf ihre Eignung getestet werden.

Der wichtigste Schritt der Synthese, die Cyclisierung des linearen Peptids an der Festphase, erwies sich als schwierig. In Lösung muss bei der Cyclisierung von Peptiden, wie bei der Faltung von Peptiden, mit sehr hoher Verdünnung gearbeitet werden. Nur so kann die gewünschte intramolekulare Reaktion (Cyclisierung) stattfinden und der Anteil an gleichzeitig ablaufenden intermolekularen Reaktionen (Bildung von Polymeren) klein gehalten werden. Diese Voraussetzung ist bei der Cyclisierung an der Festphase nicht gegeben. Nur die Ausbildung einer cyclusähnlichen Präkonformation durch intramolekulare Wasserstoffbrücken des linearen Peptids kann die intermolekularen Kupplungen vermindern.

Eine Vergleichssynthese von Cyclosporin A unter Verwendung von tiefer beladenen Laternen könnte aufzeigen, ob die Cyclisierungsausbeute auf diesem Weg gesteigert werden könnte. Die Beladung der Laternen müsste jedoch so tief angesetzt werden, dass nur noch sehr wenig Substanz an einer Laterne synthetisiert werden kann.

Der geplante Aufbau einer grossen Substanzbibliothek und eines entsprechenden Screenings der Cyclosporinderivate wurde nicht mehr durchgeführt. Erst die beschriebenen Optimierungsversuche des Synthesystems würden die Grundlage

für einen, erfolgreichen Aufbau der Substanzbibliothek schaffen. Dennoch könnte das entwickelte System auch zum Aufbau von anderen cyclischen Peptiden genutzt werden, welche in ihrer Peptidkette Aminosäuren mit Hydroxyseitenketten enthalten.

Experimenteller Teil

8 Vorbemerkungen

8.1 Physikalische Daten

¹H-NMR-Spektroskopie

Geräte: Varian Gemini VXR 300 (300 MHz), Varian Gemini VXR 400 (400 MHz), Bruker DRX 500 (500 MHz).

Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, bezogen auf zugesetztes Tetramethylchlorsilan ($\delta = 0.0$) in Chloroform- d_1 , beziehungsweise auf Dimethylsulfoxid- d_6 ($\delta = 2.50$), oder die teildeutierten Methylgruppen von Methanol- d_4 ($\delta = 3.34$). Bei aufgespaltenen Signalen mit definierter Multiplizität ist die Verschiebung durch das arithmetische Mittel der Signallinien charakterisiert. Bei Multipletts ist der Bereich angegeben. Alle Spektren sind nach der ersten Ordnung interpretiert und die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz angegeben. Die Signale wurden wie folgt bezeichnet: s = Singlett, bs = breites Singlett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, sept = Septett, m = Multiplett. Falls nötig wurden die Signale mittels COSY, HMBC, HMQC und NOESY-Messungen klassifiziert.

¹³C-NMR-Spektroskopie

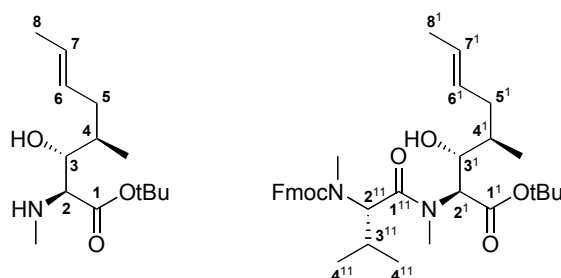
Geräte: Varian Gemini VXR 300 (75.5 MHz), Varian Gemini VXR 400 (101 MHz), Bruker DRX 500 (125.8 MHz).

Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die folgenden Lösungsmittelsignale: $\delta = 77.0$ (Chloroform- d_1), $\delta = 39.5$ (Dimethylsulfoxid- d_6) und $\delta = 49.9$ (Methanol- d_4). Die Spektren sind ¹H-breitbandentkoppelt, die Zuordnung der Signale erfolgte durch APT, HMQC (145 Hz) und HMBC-Spektren (7 Hz).

Kennzeichnung und Nummerierung der Kerne

Die Protonenkennzeichnung erfolgt nach dem zugehörigen C-Atom. Die Nummerierung der Peptide wurde analog der Nummerierung in der Peptidkette von

Cyclosporin A durchgeführt. In jeder Aminosäure erfolgte die Nummerierung vom C-Terminus zum N-Terminus (*Schema 32*).



Schema 32 Nummerierung der Kerne

UV/VIS-Spektroskopie

Gerät: Perkin-Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 2.

Elektrospray-Massenspektroskopie (ESI-MS)

Gerät: Finnigan MAT LCQ, Oktapoliges Massenspektrometer.

Die Analysenproben wurden in Lösung direkt injiziert. Die Ionenerzeugung erfolgte durch Elektronenstossionisation. Alle Angaben beziehen sich auf atomare Masseneinheiten pro Elementarladung (m/z). Die Intensitäten der Signale sind in Prozent des Basisions in Klammer angegeben.

8.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel 60 F₂₅₄ Aluminiumfolien der Firma Merck mit einer Schichtdicke von 0.2 mm. Die Detektion von nicht UV-aktiven Verbindungen erfolgte mittels:

- Eintauchen in eine Cerammoniumsulfatlösung (10 g Cer(IV)sulfat Tetrahydrat, 25 g Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat, 100 mL konzentrierte Schwefelsäure und 900 mL Wasser) und anschließende Erwärmung.
- Eintauchen in eine Permanganatlösung (3 g Kaliumpermanganat, 5 mL 5%ige Natronlauge, 20 g Kaliumcarbonat und 300 mL Wasser) und anschließende Erwärmung.
- Eintauchen in eine Ninhydrinlösung (300 mg Ninhydrin, 100 mL n-Butanol und 3 mL Essigsäure) und anschließende Erwärmung.

Säulenchromatographie

Flash-Säulenchromatographie wurde unter erhöhtem Druck (~ 1.5 bar, Aquariummembranpumpe) an Kieselgel C 560 KV (35-70 μm) der Firma Uetikon oder Kieselgel 60 (40-63 μm) der Firma Merck durchgeführt. Die angegebenen Lösungsmittelverhältnisse bei Gemischen beziehen sich auf Volumenanteile.

HPLC

Geräte: Waters 600 Pumpe, Waters 600 Controller und Waters 2487 UV-Detektor; Waters Alliance und Photodioden Array UV-Detektor (PDA).

Säulen: Merck LiChrospher Si60 (5 μm), Dimensionen 250 x 4 mm, Fluss 1 mL/min.

8.3 Chemikalien, Lösungsmittel und Festphase

Chemikalien

Aminosäuren wurden normalerweise bei *Bachem*, *NovaBiochem* oder *Senn-Chemicals* bestellt, alle anderen zur Synthese eingesetzten Substanzen wurden über *Fluka Chemie AG* bezogen. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt.

Gewisse Peptidbausteine, insbesondere die Aminosäure MeBmt und das Cyclosporinderivat CsC wurden in verdankenswerter Weise von Dr. R. M. Wenger beziehungsweise durch die Firma *Novartis* zur Verfügung gestellt.

Lösungsmittel

Diethylether und THF wurden nach Standardvorschriften über Natrium oder Natriumhydrid frisch absolutiert. Die weiteren absoluten Lösungsmittel wurden von *Fluka Chemie AG* bezogen und ohne zusätzliche Reinigung direkt eingesetzt. Die übrigen Lösungsmittel für chemische Umsetzungen und chromatographische Reinigungsschritte wurden von *Fluka Chemie AG*, *Romil Chemicals*, *Machler* und *J. T. Baker* bezogen und ebenfalls direkt eingesetzt.

Festphase

Für die Experimente an der Festphase wurde mit Laternen der Firma *Mimotopes* gearbeitet. Verwendete Typen: *SynPhase Polystyrene D-Series*, *SynPhase Polyamide D-Series* (jeweils aminomethyliert).

Chemische Reaktionen wurden in speziellen Glasgefäßen oder Spritzen mit integrierter Fritte der Firma MultiSyntech durchgeführt. Während der Synthesen gelang ein mechanischer Schüttler zum Einsatz, der die Durchmischung sicherstellte.

9 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) im Umgang mit den verwendeten Festphasenlaternen

AAV1: Freisetzung von SynPhase Laternen

Die Aminogruppen der eingesetzten SynPhase Laternen des Typs AMM der Firma Mimotopes wurden als TFA-Salz geliefert. Die Freisetzung der Laternen nach Vorschrift von Mimotopes beinhaltet folgende Waschschriffe der Laternen (jeweils 2.5 mL Lösungsmittel pro eingesetzte Laterne):

5% TEA in 50% DMF/DCM (2 x 10 Minuten), 50% DMF/DCM (5 Minuten), DCM (5 Minuten), 50% DMF/DCM (5 Minuten), DCM (5 Minuten).

AAV2: Spaltung der Fmoc-Schutzgruppen

Die Spaltung der Fmoc-Schutzgruppen (von Spacern oder während der Peptidsynthese) beinhaltet folgende Schritte (jeweils 2.5 mL pro eingesetzte Laterne):

20% Piperidin/DMF (30 Minuten), DMF (4 x 3 Minuten), DCM (4 x 3 Minuten).

AAV3: Spaltung der Boc-Schutzgruppen

Die Spaltung der Boc-Schutzgruppen (von Spacern) beinhaltet folgende Schritte (jeweils 2.5 mL pro eingesetzte Laterne):

HCl/Dioxan 4N (60 Minuten), Dioxan (4 x 3 Minuten), DCM (4 x 3 Minuten), anschliessende Freisetzung der Laternen erfolgt nach AAV1.

AAV4: Waschen der Laternen

Die Laternen werden nach Beladungen, Peptidkupplungen und Acetylierungen nach folgendem Schema gewaschen (jeweils 2.5 mL pro eingesetzte Laterne):

DMF (4 x 3 Minuten), DCM (4 x 3 Minuten).

10 Bestimmung der Beladung der Festphase

10.1 Quantifizierung der Fmoc-Abspaltung (BBV1)

Die Festphasenlaterne wurde mit 20% Piperidin in DMF (10 mL) während 45 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Anschliessend wurde 1 mL dieser Spallösung mit 20% Piperidin in DMF (20 mL) verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurde in einer Glasküvette (1 cm) die Absorbtion bei 301 nm bestimmt.

Die Beladung der Laterne wurde über folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Beladung} = \left[(A_{301} / \epsilon) * 21 * 10^4 \right] \mu\text{mol/Laterne} \quad \epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

10.2 Quantifizierung der freien Aminogruppen (BBV2)

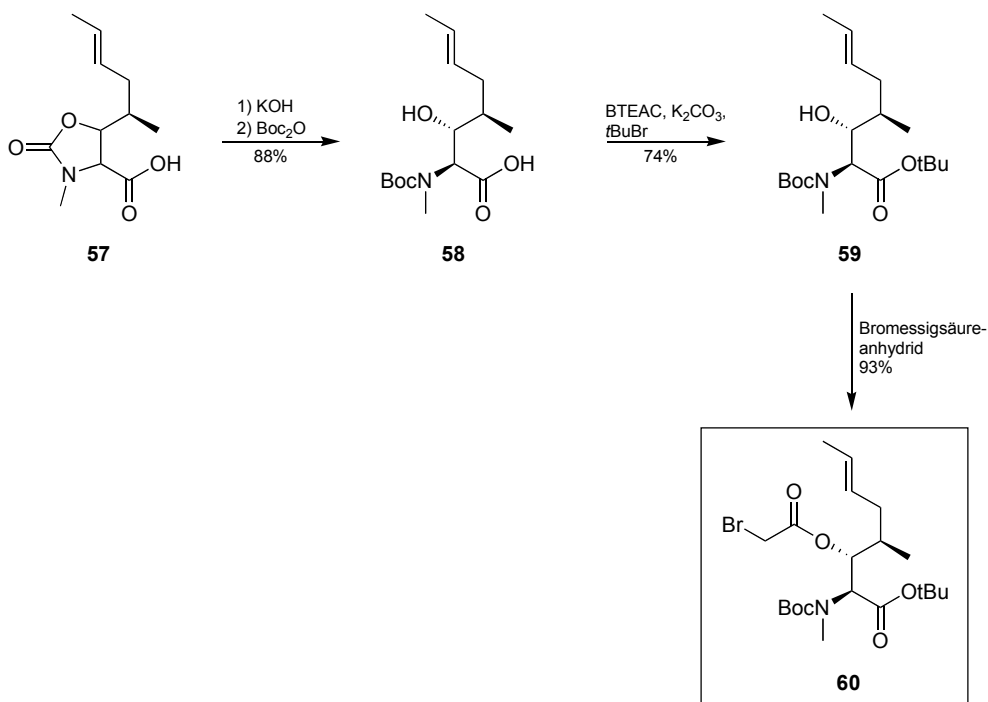
Die Aminogruppe wurde durch Spaltung der Boc-Schutzgruppe freigesetzt. Anschliessend wurde die Laterne mit 5% DIEA/DCM (3 x, 3 mL) und DCM (5 x, 3 mL) vorgewaschen. Durch die anschliessende Behandlung mit 0.1 M Pikrinsäurelösung in DCM (3 x, 3 mL) wurde auf der Laterne das Pikrat gebildet, welches nach dem Spülen der Laterne mit DCM (5 x, 3 mL) mit 5% DIEA/DCM (6 x, 3 mL) wieder freigesetzt wurde. Die DIEA/DCM Lösungen (6 x) wurden in einem 500 mL Messkolben gesammelt und Ethanol verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurde in einer Glasküvette (1 cm) die Absorbtion bei 358 nm bestimmt.

Die Beladung der Laterne wurde über folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Beladung} = \left[(A_{358} / \epsilon) * 500 * 10^3 \right] \mu\text{mol/Laterne} \quad \epsilon = 14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

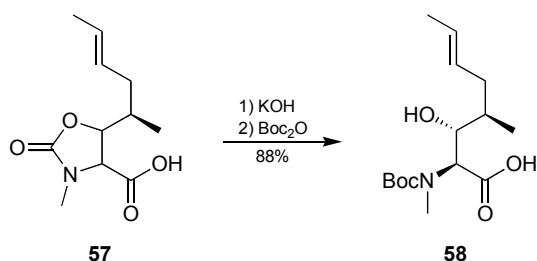
11 Synthese der Linkervorläufer

11.1 Synthese von Boc-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (60)



Schema 33 Synthese des Linkervorläufers **60**

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-methyl-amino-6-octensäure (58, Boc-MeBmt-OH)



Das geschützte MeBmt-Derivat **57** (10.1 g, 44.4 mmol) wurde in 2N KOH (100 ml, 200 mmol, 4.5 eq.) während 10 h bei 60°C gerührt und dabei quantitativ entschützt. Im Eisbad wurde auf 0°C gekühlt und Wasser (20 ml), sowie Dioxan (100 ml)

zugegeben. Nach dem Zutropfen von Boc_2O (14.5 g, 66.6 mmol, 1.5 eq.) gelöst in Dioxan (20 ml) wurde für 20 h bei RT weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde anschliessend am Rotationsverdampfer eingeengt und mit Wasser in einen Scheidetrichter überführt. Nach zweimaligem Waschen mit Ether wurde die Lösung mit 4N HCl vorsichtig auf pH 2 angesäuert und in Essigester aufgenommen. Die Essigesterextrakte wurden mit 10%iger Zitronensäurelösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Einengen am Vakuum wurden 11.8 g (39.1 mmol, 88%) des Produktes **58** als farbloses Öl erhalten.

$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (301.38)

R_f (DCM / MeOH / Essigsäure 20:1:1) = 0.33.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):

5.51-5.38 (*m*, 2H, H-(C6), H-(C7)); 4.51 (*s*, 1H, H-(C2)); 3.98-3.94 (*m*, 1H, H-(C3)); 2.96 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 2.40-2.34 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.97-1.90 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.68-1.61 (*m*, 1H, H-(C4)); 1.65 (*d*, $J = 5.3$, 3H, H-(C8)); 1.46 (*s*, 9H, tBu); 0.85 (*d*, $J = 6.8$, 3H, $\text{CH}_3\text{-(C4)}$).

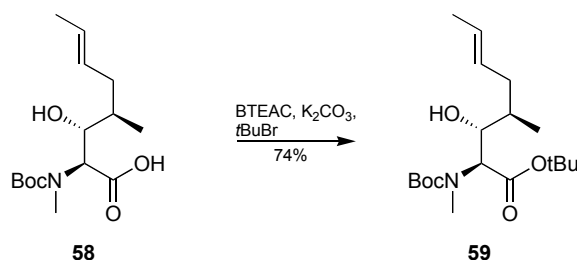
^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):

175.1 (C1); 158.0 (Boc); 129.4 (C6); 127.5 (C7); 81.4 (Boc); 75.7 (C3); 63.8 (C2); 36.6 (C4); 36.2 (C5); 28.7 (Boc); 21.1 ($\text{CH}_3\text{-N}$); 18.4 (C8); 16.1 ($\text{CH}_3\text{-(C4)}$).

MS (ESI-MS, m/z):

324.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 268.2 ($[\text{M-tBu}+\text{Na}]^+$, 15).

N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-Hydroxy-4-methyl-2-methyl-amino-6-octensäure-tert-butylester (58, Boc-MeBmt-OtBu)



Boc-MeBmt-OH (**58**, 8.33 g, 27.6 mmol) wurde zusammen mit Kaliumcarbonat (99.1 g, 718 mmol, 26 eq.) und Benzyltriethyl-ammoniumchlorid (BTEAC, 5.13 g, 27.6 mmol, 1 eq.) in Dimethylacetamid (210 ml) gelöst. Nach der Zugabe von *tert*-Butylbromid (149 ml, 1.32 mol, 48 eq.) wurde die Reaktionslösung auf 55°C erwärmt und über Nacht gerührt. Die entstandene weisse Suspension wurde auf RT abgekühlt, und anschliessend mit Wasser und Essigester in einen Scheidetrichter überführt. Danach wurde mit 10%iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 9:1) gereinigt. Man erhielt 7.32 g (2.05 mmol, 74%) Boc-MeBmt-OtBu (**59**) als farbloses Öl.

$\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}_5$ (357.49)

R_f (Hexan / Essigester 4:1) = 0.30.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): Rotamere A/B ~1:0.85

5.52-5.39 (*m*, 4H, H-(C6), H-(C7)); 4.66 (*bs*, 1H, H-(C2), B); 4.40 (*bs*, 1H, H-(C2), A); 3.90 (*m*, 1H, H-(C3), B); 3.86 (*m*, 1H, H-(C3), A); 2.94 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$, B); 2.91 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$, A); 2.43 (*m*, 1H, H-(C5), A); 2.33 (*m*, 1H, H-(C5), B); 1.96 (*m*, 1H, H-(C5), B); 1.90 (*m*, 1H, H-(C5), A); 1.68 (*m*, 1H, H-(C4), B); 1.66 (*d*, $J = 5.5$, 3H, H-(C8), A); 1.64 (*d*, $J = 7.4$, 3H, H-(C8), B); 1.59 (*m*, 1H, H-(C4), A); 1.47 (*s*, 27H,

*t*Bu); 1.45 (*s*, 9H, *t*Bu, B); 0.86 (*d*, *J* = 6.5, 3H, CH₃-(C4), B); 0.84 (*d*, *J* = 6.7, 3H, CH₃-(C4), A).

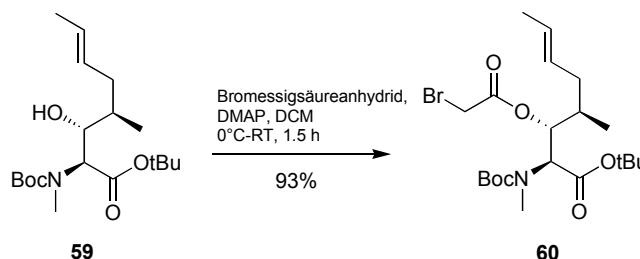
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1:0.85

169.8 (C1, A); 157.3 (Boc, A); 156.1 (Boc, B); 129.4 (C6, A); 129.1 (C6, B); 127.0 (C7, B); 126.8 (C7, A); 82.1 (*t*Bu, B); 81.9 (*t*Bu, A); 80.3 (2C, *t*Bu); 75.5 (C3, A); 75.0 (C3, B); 63.7 (C2, A); 61.2 (C2, B); 35.8 (CH₃-N, A); 35.7 (C5, A); 35.5 (C5, B); 35.2 (2C, C4); 32.3 (CH₃-N, B); 28.3, 28.1 (*t*Bu); 18.0 (2C, C8); 15.7 (2C, CH₃-(C4)).

MS (ESI-MS, *m/z*):

380.1 ([M+Na]⁺, 100); 324.1 ([M-*t*Bu+Na]⁺, 18); 268.2 ([M-2*t*Bu+Na]⁺, 8).

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-3-bromacetox-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-*tert*-butylester (60, Boc-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu)**



Boc-MeBmt-OtBu (**59**, 1.70 g, 4.76 mmol) wurde in DCM (30 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von DMAP (1.75 g, 14.3 mmol, 3 eq.) wurde Bromessigsäureanhydrid (5.72 g, 65%-Lösung in Acetonitril, 14.3 mmol, 3 eq.) langsam in Portionen zugetropft. Anschliessend wurde das Eisbad entfernt und während 1.5 h bei RT gerührt. Die braune Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und direkt an Kieselgel gereinigt (Uetikon, Hexan / Essigester 7:1, Auftragen in DCM). Man erhielt 2.12 g (4.43 mmol, 93%) des gewünschten Bromacetates **60** als farbloses Öl.

C₂₁H₃₆NO₆Br (478.42)

R_f (Hexan / Essigester 3:1) = 0.44.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

5.48-5.33 (*m*, 3H, H-(C3), H-(C6), H-(C7)); 5.17 (*d*, $J = 5.0$, 1H, H-(C2)); 3.80 (*s*, 2H, H-(C^{Br})); 2.94 (*s*, 3H, CH₃-N); 2.16-2.11 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.87-1.76 (*m*, 2H, H-(C4), H-(C5)); 1.66 (*d*, $J = 5.8$, 3H, H-(C8)); 1.47 (*s*, 9H, tBu); 1.44 (*s*, 9H, tBu); 0.93 (*d*, $J = 6.6$, 3H, CH₃-(C4)).

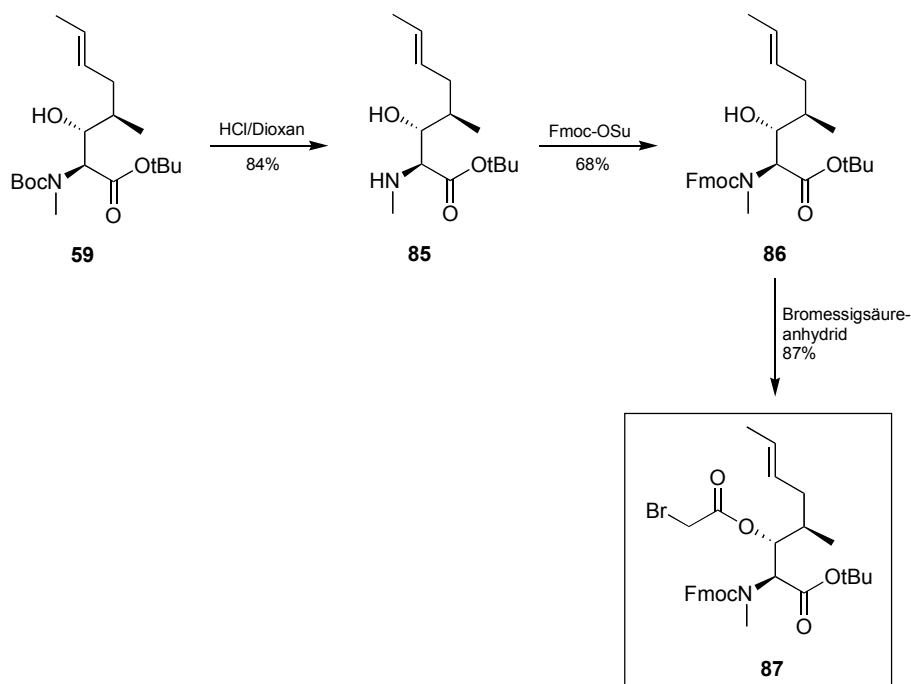
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

168.2 (C1); 166.0 (C^{Br}); 156.5 (Boc); 128.7 (C6); 127.1 (C7); 82.4 (tBu); 80.3 (Boc); 78.6 (C3); 59.0 (C2); 35.2 (C5); 35.0 (CH₃-N); 32.7 (C4); 28.3 (tBu); 27.9 (Boc); 18.0 (C8); 15.5 (CH₃-(C4)).

MS (ESI-MS, m/z):

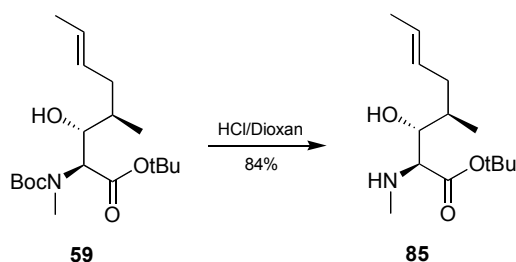
502.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 99); 500.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 446.2 ($[\text{M}-t\text{Bu}+\text{Na}]^+$, 7); 444.3 ($[\text{M}-t\text{Bu}+\text{Na}]^+$, 7).

11.2 Synthese von Fmoc-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (87)



Schema 34 Synthese des Linkervorläufers **87**

(2S, 3R, 4R, 6E)-3-Hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (85, H-MeBmt-OtBu)



Boc-MeBmt-OtBu (**59**, 824 mg, 2.31 mmol) wurde im Eisbad auf 0°C vorgekühlt. Nach der Zugabe von 4N HCl in Dioxan (15 ml, 60 mmol, 26 eq.) wurde das Reaktionsgemisch 10 min im Eisbad belassen und anschliessend auf RT erwärmt. Nach 1h wurde am Wasserstrahlvakuum der Überschuss an HCl entfernt und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt (als HCl-Salz) wurde chromatografisch an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester / Triethylamin 60:10:1) gereinigt. Es wurden 500 mg (1.94 mmol, 84%) der entschützten Aminosäure **85** als farbloses Öl erhalten.

C₁₄H₂₇NO₃ (257.37)

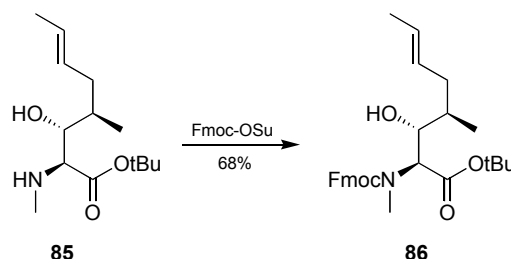
R_f (Hexan / Essigester / TEA 30:10:1) = 0.27.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

5.51-5.37 (*m*, 2H, H-(C6), H-(C7)); 3.38 (*dd*, *J* = 4.8, 6.8, 1H, H-(C3)); 3.03 (*d*, *J* = 6.8, 1H, H-(C2)); 2.42 (*s*, 3H, CH₃-N); 2.33-2.25 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.93-1.85 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.66 (*d*, *J* = 5.1, 3H, H-(C8)); 1.66-1.57 (*m*, 1H, H-(C4)); 1.49 (*s*, 9H, tBu); 0.96 (*d*, *J* = 6.8, 3H, CH₃-(C4)).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

173.4 (C1); 129.9 (C6); 126.3 (C7); 81.8 (tBu); 76.0 (C3); 66.2 (C2); 35.9 (CH₃-N); 35.1 (C4); 34.0 (C5); 28.1 (tBu); 17.9 (C8); 16.5 (CH₃-(C4)).

MS (ESI-MS, m/z):280.1 ($[M+Na]^+$, 100); 258.2 ($[M+H]^+$, 7).**N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (86, Fmoc-MeBmt-OtBu)**

H-MeBmt-OtBu (**85**, 1.44 g, 5.60 mmol) wurde zusammen mit Fmoc-OSu (2.83 g, 8.40 mmol, 1.5 eq.) in DCM (20 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C vorgekühlt. Nach der Zugabe von DIEA (1.44 ml, 8.40 mmol, 1.5 eq.) wurde das Eisbad entfernt und 2 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und das erhaltene Öl mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt. Danach wurde mit 10%iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 6:1) gereinigt. Man erhielt 1.82 g des MeBmt-Derivats **86** (3.79 mmol, 68%) als farbloses Öl.

 $C_{29}H_{37}NO_5$ (479.61) R_f (Hexan / Essigester 3:1) = 0.26. **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):** Rotamere A/B ~3:1

7.78-7.76 (m, 4H, H-(C7^{Fmoc})); 7.63-7.57 (m, 4H, H-(C4^{Fmoc})); 7.41 (m, 2H, H-(C6^{Fmoc}), A); 7.39 (m, 2H, H-(C6^{Fmoc}), B); 7.32 (m, 2H, H-(C5^{Fmoc}), A); 7.30 (m, 2H, H-(C5^{Fmoc}), B); 5.53-5.36 (m, 4H, H-(C6), H-(C7)); 4.66 (dd, $J = 5.9, 10.6$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.54 (bs, 2H, H-(C2)); 4.46 (dd, $J = 7.4, 10.6$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.43 (dd, $J = 6.9, 10.6$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.37 (dd, $J = 6.3, 10.6$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B);

4.29 (*t*, $J = 7.0$, 1H, H-(C2^{Fmoc}), A); 4.22 (*t*, $J = 6.0$, 1H, H-(C2^{Fmoc}), B); 3.90 (*m*, 1H, H-(C3), A); 3.83 (*m*, 1H, H-(C3), B); 3.05 (*s*, 3H, CH₃-N, A); 2.64 (*s*, 3H, CH₃-N, B); 2.43 (*m*, 1H, H-(C5), A); 2.23 (*m*, 1H, H-(C5), B); 1.93 (*m*, 1H, H-(C5), A); 1.90 (*m*, 1H, H-(C5), B); 1.67 (*d*, $J = 5.4$, 3H, H-(C8), A); 1.65 (*d*, $J = 6.0$, 3H, H-(C8), B); 1.59 (*m*, 1H, H-(C4), A); 1.58 (*m*, 1H, H-(C4), B); 1.48 (*s*, 9H, *t*Bu, A); 1.44 (*s*, 9H, *t*Bu, B); 0.86 (*d*, $J = 6.7$, 3H, CH₃-(C4), A); 0.68 (*d*, $J = 6.8$, 3H, CH₃-(C4), B).

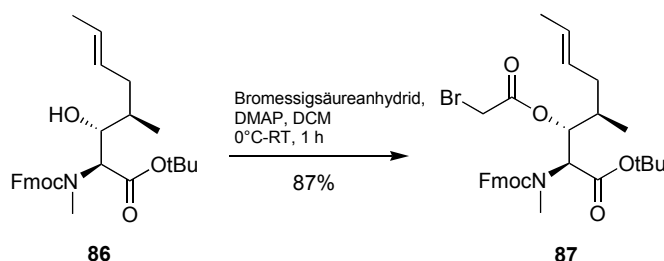
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~3:1

169.9 (C1, B); 169.4 (C1, A); 157.8 (Fmoc, A); 156.7 (Fmoc, B); 144.1, 144.0, 143.9, 143.8 (4C, C3^{Fmoc}); 141.3 (4C, C8^{Fmoc}); 129.2 (C6, A); 129.0 (C6, B); 127.8 (2C, C4^{Fmoc}, B); 127.7 (4C, C6^{Fmoc}); 127.2, 127.1, 127.0 (6C, C7, C5^{Fmoc}); 125.1, (2C, C4^{Fmoc}, A); 120.0 (4C, C7^{Fmoc}); 82.4 (*t*Bu, B); 82.3 (*t*Bu, A); 75.7 (C3, A); 74.9 (C3, B); 67.9 (C1^{Fmoc}, A); 67.5 (C1^{Fmoc}, B); 63.9 (C2, A); 60.9 (C2, B); 47.3 (C2^{Fmoc}, B); 47.2 (C2^{Fmoc}, A); 36.1 (2C, C4); 35.9 (C5, A); 35.3 (CH₃-N, A); 35.2 (C5, B); 32.7 (CH₃-N, B); 28.1 (*t*Bu, A); 28.0 (*t*Bu, B); 18.0 (2C, C8); 15.8 (2C, CH₃-(C4)).

MS (ESI-MS, m/z):

502.3 ([M+Na]⁺, 100); 446.4 ([M-*t*Bu+Na]⁺, 4).

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-bromacetox-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester
(87, Fmoc-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu)



Fmoc-MeBmt-OtBu (**86**, 1.80 g, 3.75 mmol) wurde in DCM (20 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von DMAP (1.37 g, 11.3 mmol, 3 eq.) wurde Bromessigsäureanhydrid (4.50 g, 65%-Lösung in Acetonitril, 11.3 mmol, 3 eq.) langsam in Portionen zugetropft. Anschliessend wurde das Eisbad entfernt und

während 1 h bei RT gerührt. Die braune Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und direkt an Kieselgel gereinigt (Uetikon, Hexan / Essigester 7:1, Auftragen in DCM). Man erhielt 1.96 g (3.26 mmol, 87%) des gewünschten Bromacetates **87** als farbloses Öl.

$C_{31}H_{38}NO_6Br$ (600.55)

R_f (Hexan / Essigester 5:1) = 0.25.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): Rotamere A/B ~2:1

7.79-7.75 (*m*, 4H, H-(C7^{Fmoc})); 7.62-7.55 (*m*, 4H, H-(C4^{Fmoc})); 7.43-7.37 (*m*, 4H, H-(C6^{Fmoc})); 7.32-7.29 (*m*, 4H, H-(C5^{Fmoc})); 5.46 (*dd*, $J = 4.7, 8.7$, 1H, H-(C3), A); 5.43 (*m*, 1H, H-(C7), A); 5.40 (*m*, 1H, H-(C7), B); 5.35 (*m*, 1H, H-(C6), A); 5.28 (*m*, 2H, H-(C3), H-(C6), B); 5.24 (*d*, $J = 4.6$, 1H, H-(C2), A); 4.72 (*d*, $J = 6.0$, 1H, H-(C2), B); 4.64 (*dd*, $J = 5.8, 10.7$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.47 (*dd*, $J = 7.1, 10.6$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.44 (*dd*, $J = 5.9, 10.5$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.42 (*dd*, $J = 7.1, 10.6$, 1H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.29 (*bt*, $J = 7.1$, 1H, H-(C2^{Fmoc}), A); 4.23 (*bt*, $J = 5.7$, 1H, H-(C2^{Fmoc}), B); 3.80 (*s*, 2H, H-(C^{Br}), A); 3.71 (*s*, 2H, H-(C^{Br}), B); 3.08 (*s*, 3H, CH₃-N, A); 2.97 (*s*, 3H, CH₃-N, B); 2.13 (*m*, 1H, H-(C5), A); 2.03 (*m*, 1H, H-(C5), B); 1.82 (*m*, 1H, H-(C5), A); 1.75 (*m*, 1H, H-(C4), A); 1.70 (*m*, 2H, H-(C4), H-(C5), B); 1.66 (*d*, $J = 6.3$, 3H, H-(C8), A); 1.65 (*d*, $J = 6.2$, 3H, H-(C8), B); 1.45 (*s*, 9H, *t*Bu, A); 1.41 (*s*, 9H, *t*Bu, B); 0.93 (*d*, $J = 6.6$, 3H, CH₃-(C4), A); 0.68 (*d*, $J = 6.4$, 3H, CH₃-(C4), B).

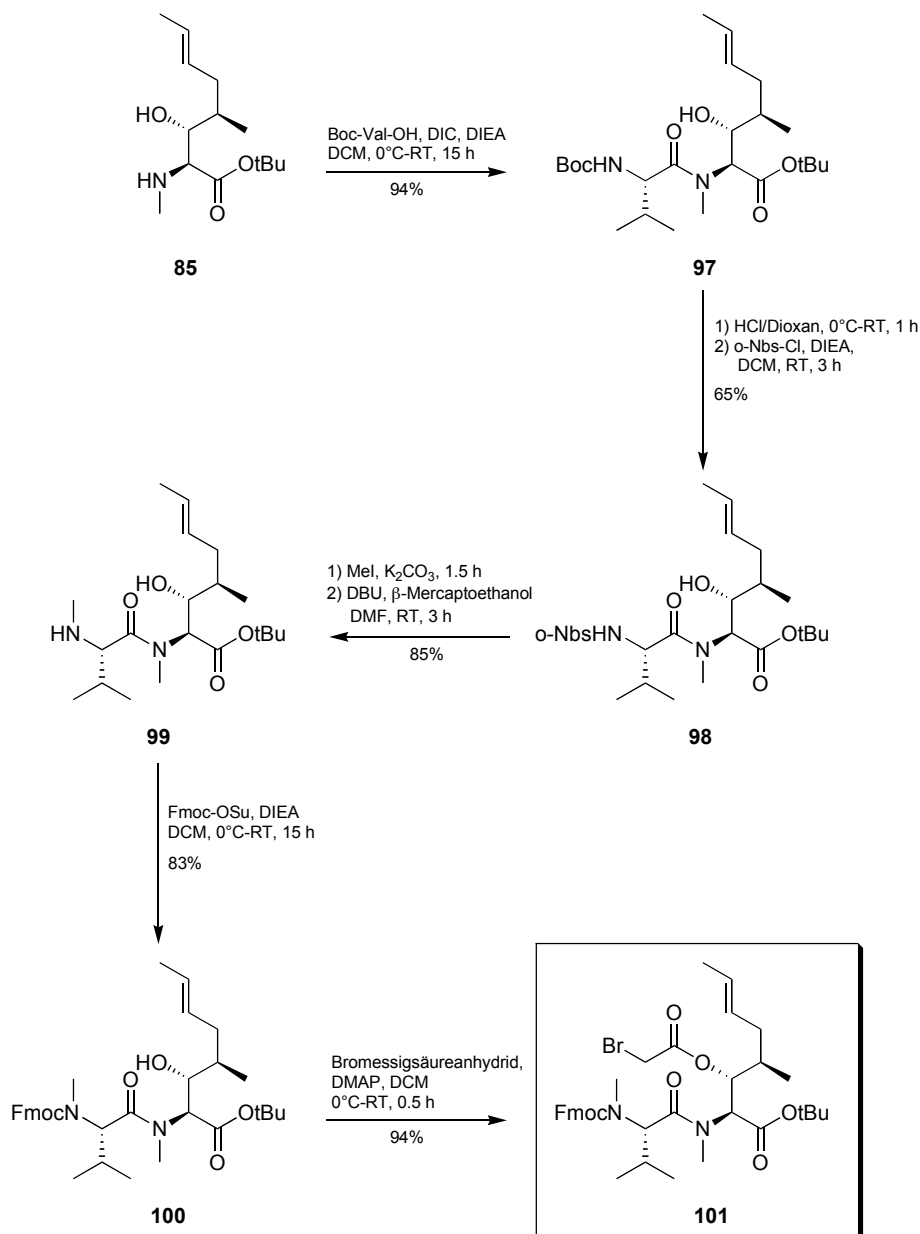
^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): Rotamere A/B ~3:1

167.8 (C1, A); 167.5 (C1, B); 166.1 (C^{Br}, A); 166.0 (C^{Br}, B); 157.3 (Fmoc, A); 156.3 (Fmoc, B); 144.0, 143.9, 143.8, 143.7 (4C, C3^{Fmoc}); 141.4 (4C, C8^{Fmoc}); 128.7 (C6, A); 128.6 (C6, B); 127.8, 127.7 (4C, C6^{Fmoc}); 127.3 (C7, A); 127.1 (5C, C5^{Fmoc}, C7, B); 125.1, 125.0 (2C, C4^{Fmoc}, A); 124.7, 124.6 (2C, C4^{Fmoc}, B); 120.1, 120.0 (4C, C7^{Fmoc}); 82.8 (*t*Bu); 78.6 (C3, A); 77.1 (C3, B); 68.0 (C1^{Fmoc}, A); 67.6 (C1^{Fmoc}, B); 59.7 (C2, A); 59.5 (C2, B); 47.2 (2C, C2^{Fmoc}); 31.1 (C4, C5, A); 34.7 (C4, C5, B); 32.6 (CH₃-N, A); 32.2 (CH₃-N, B); 28.0 (*t*Bu); 25.5 (C^{Br}, A); 25.4 (C^{Br}, B); 18.0 (2C, C8); 15.8 (2C, CH₃-(C4)).

MS (ESI-MS, m/z):

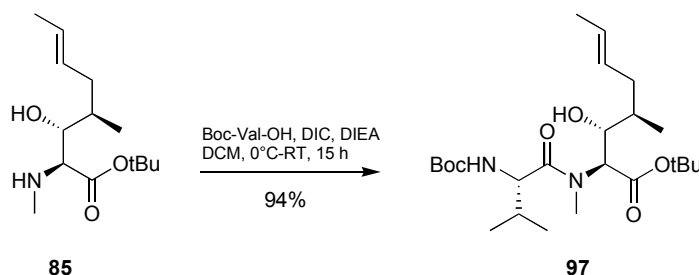
624.2 ($[M+Na]^+$, 100); 622.3 ($[M+Na]^+$, 99); 568.4 ($[M-tBu+Na]^+$, 5); 566.4 ($[M-tBu+Na]^+$, 6).

11.3 Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (101)



Schema 35 Synthese von Fmoc-MeValMeBmt(COCH₂Br)-OtBu (**101**)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-valyl-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (97, Boc-Val-MeBmt-OtBu)



Boc-Val-OH (6.01 g, 27.6 mmol, 2.4 eq) wurde in DCM (20 ml) vorgelegt und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von DIC (2.14 ml, 13.8 mmol, 1.2 eq.) liess man die Lösung 20 min im Eisbad rühren. Die entstehende Trübung zeigte die gleichzeitige Bildung des Harnstoffs und des symmetrischen Anhydrids an. Die Reaktionslösung wurde anschliessend in einen zweiten Kolben mit H-MeBmt-OtBu (**85**) (2.96 g, 11.5 mmol) gelöst DCM (20 ml) überführt. Man liess die Lösung nach der Zugabe von DIEA (2.36 ml, 13.8 mmol, 1.2 eq.) über Nacht unter Rühren auf RT erwärmen. Die nun gelblich gefärbte Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt. Danach wurde mit 10%iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogen-carbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschliessend chromatographisch an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 6:1) gereinigt. Es wurden 4.92 g (10.8 mmol, 94%) des Dipeptids **97** als farbloser, harzartiger Feststoff erhalten.

C₂₄H₄₄N₂O₆ (456.62)

R_f (Hexan / Essigester 3:1) = 0.27.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

5.49-5.38 (*m*, 2H, H-(C6¹), H-(C7¹)); 5.17 (*d*, *J* = 9.1, 1H, H-(C2¹)); 4.48 (*dd*, *J* = 6.7, 9.2, 1H, H-(C2¹¹)); 3.97 (*m*, 1H, H-(C3¹)); 3.23 (*s*, 3H, CH₃-N¹); 2.32 (*m*, 1H, H-

(C5¹¹); 1.99 (*m*, 1H, H-(C3¹¹)); 1.93 (*m*, 1H, H-(C5¹)); 1.64 (*d*, *J* = 5.9, 3H, H-(C8¹)); 1.58 (*m*, 1H, H-(C4¹)); 1.46 (*s*, 9H, *t*Bu¹); 1.42 (*s*, 9H, *t*Bu¹¹); 1.00 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4¹¹)); 0.94 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4¹¹)); 0.82 (*d*, *J* = 6.7, 3H, CH₃-(C4¹)).

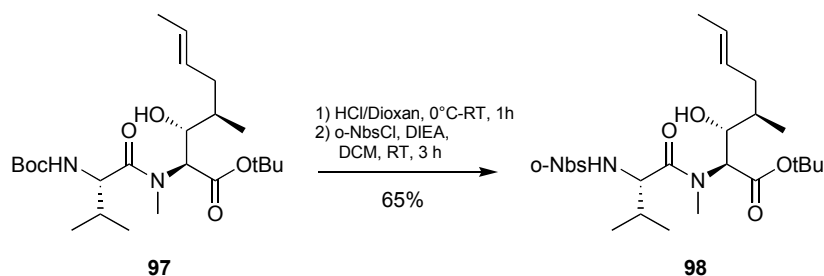
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

174.0 (C1¹¹); 169.5 (C1¹); 155.9 (Boc); 129.1 (C6¹); 127.0 (C7¹); 82.4 (*t*Bu¹); 79.6 (*t*Bu¹¹); 75.6 (C3¹); 60.3 (C2¹, C2¹¹); 35.8 (C5¹); 35.6 (C4¹); 34.8 (CH₃-N¹); 31.0 (C3¹¹); 28.3 (*t*Bu¹¹); 28.1 (*t*Bu¹); 19.6 (C4¹¹); 18.0 (C8¹); 17.6 (C4¹¹); 15.8 (CH₃-(C4¹)).

MS (ESI-MS, *m/z*):

479.3 ([M+Na]⁺, 100); 423.4 ([M-*t*Bu+Na]⁺, 3).

***N*-(*o*-Nitrobenzolsulfonyl)-valyl-(2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-*tert*-butylester (98)**



4.57 g (10.0 mmol) Boc-Val-MeBmt-OtBu (**97**) wurden mit einem vorgekühlten Gemisch aus HCl in Dioxan (100 ml, 4 N Lösung, 400 mmol) umgesetzt. Nach 10 min Rühren im Eisbad und anschliessender 60 min Reaktionszeit bei RT wurde die überschüssige HCl am Wasserstrahlvakuum entfernt. Die restliche Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mit DCM koevaporiert.

Das erhaltene Öl wurde in 100 mL DCM gelöst und im Eisbad abgekühlt. Anschliessend wurde die Lösung mit DIEA (5.1 mL, 30 mmol) und o-NbsCl (6.65 g, 30 mmol) versetzt. Das Eisbad wurde entfernt und 3 h bei RT ausgerührt. Danach wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde mit 10%iger

Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer zum Öl eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschliessend chromatographisch an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 5:2) gereinigt. Es wurden 3.52 g (6.50 mmol, 65%) des geschützten Dipeptids **98** als gelblicher Schaum erhalten.

$C_{25}H_{39}N_3O_8S$ (541.66)

R_f (Hexan / Aceton 2:1) = 0.37.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

8.08 (m, 1H, H-(C3^{Nbs})); 7.86 (m, 1H, H-(C6^{Nbs})); 7.68 (m, 1H, H-(C4^{Nbs}), H-(C5^{Nbs})); 6.45 (d, J = 9.1, 1H, HN¹¹); 5.45 (m, 1H, H-(C7¹)); 5.33 (m, 1H, H-(C6¹)); 5.00 (d, J = 4.1, 1H, H-(C2¹)); 4.41 (dd, J = 3.9, 8.9, 1H, H-(C2¹¹)); 3.82 (m, 1H, H-(C3¹)); 3.08 (s, 3H, CH₃-N¹); 2.52 (bs, 1H, HO-(C3¹)); 2.18 (m, 1H, H-(C5¹)); 2.08 (m, 1H, H-(C3¹¹)); 1.80 (ddd, J = 6.8, 13.9, 1H, H-(C5¹)); 1.70 (dd, J = 1.0, 6.3, 3H, H-(C8¹)); 1.42 (s, 9H, *t*Bu¹); 1.15 (d, J = 6.8, 3H, H-(C4¹¹)); 0.98 (m, 1H, H-(C4¹)); 0.91 (d, J = 6.8, 3H, H-(C4¹¹)); 0.42 (d, J = 6.7, 3H, CH₃-(C4¹)).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

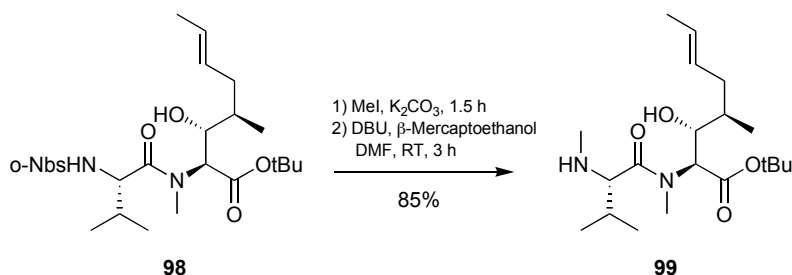
171.7 (C1¹¹); 169.0 (C1¹); 147.8 (C2^{Nbs}); 134.7 (C1^{Nbs}); 133.3 (C5^{Nbs}); 132.7 (C4^{Nbs}); 130.1 (C3^{Nbs}); 128.7 (C6¹); 127.2 (C7¹); 125.4 (C6^{Nbs}); 82.7 (*t*Bu¹); 75.3 (C3¹); 59.9 (C2¹); 58.7 (C2¹¹); 35.8 (C5¹); 35.4 (C4¹); 34.1 (CH₃-N¹); 30.5 (C3¹¹); 28.0 (*t*Bu¹); 19.8 (C4¹¹); 18.0 (C8¹); 16.2 (C4¹¹); 15.4 (CH₃-(C4¹)).

MS (ESI-MS, m/z):

564.2 ([M+Na]⁺, 100); 508.4 ([M-*t*Bu+Na]⁺, 9).

540.1 ([M-H]⁻, 100).

N-(Methyl)-valyl-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (99, H-MeVal-MeBmt-OtBu)



Zu einer Lösung aus o-Nbs-Val-MeBmt-OtBu **98** (2.40 g, 4.43 mmol) in DMF (30 ml) wurden Kaliumcarbonat (1.84 g, 13.3 mmol, 3 eq.) und MeI (556 μ l, 8.86 mmol, 2 eq.) zugegeben. Nach 1.5 h Rühren bei RT erfolgte die Zugabe von DBU (2.00 ml, 13.3 mmol, 3 eq.) und β -Mercaptoethanol (692 μ l, 13.3 mmol, 3 eq.). Während der Reaktion verfärbte sich die Reaktionslösung von dunkelblau nach olivebraun. Nach weiteren 3 h wurde die Reaktionslösung am HV eingeeengt.

Das dunkelbraune Öl wurde mit Essigester und Wasser in einen Scheidetrichter überführt und je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (je 100 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (je 100 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester / Triethylamin 20:10:1) gereinigt. Man erhielt 1.40 g (3.78 mmol, 85%) des N-Methylierten Dipeptids **99** als gelbliches Öl.

$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$ (370.53)

R_f (Essigester / Triethylamin 99:1) = 0.51.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):

5.53-5.39 (*m*, 2H, H-(C6¹), H-(C7¹)); 5.20 (*bs*, 2H, H-(C2¹)); 3.97 (*m*, 1H, H-(C3¹)); 3.26 (*d*, $J = 5.7$, 1H, H-(C2¹¹)); 3.14 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}^1$); 2.37 (*m*, 1H, H-(C5¹)); 2.31 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}^{11}$); 1.97 (*ddd*, $J = 6.8, 13.7$, 1H, H-(C5¹)); 1.84 (*m*, 1H, H-(C3¹¹)); 1.66

(*d*, *J* = 5.9, 3H, H-(C8¹)); 1.56 (*m*, 1H, H-(C4¹)); 1.47 (*s*, 9H, *t*Bu¹); 1.04 (*d*, *J* = 6.8, 3H, H-(C4¹¹)); 0.97 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4¹¹)); 0.89 (*d*, *J* = 6.7, 3H, CH₃-(C4¹)).

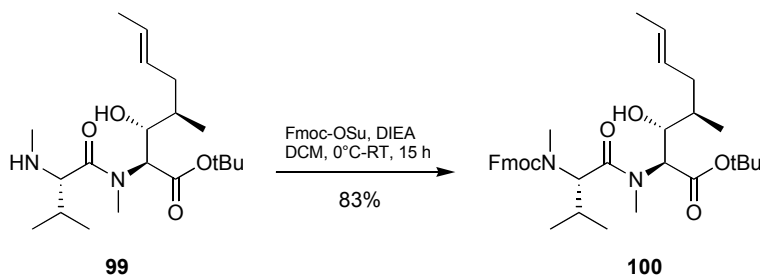
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

176.7 (C1¹¹); 169.6 (C1¹); 129.0 (C6¹); 127.1 (C7¹); 82.3 (*t*Bu¹); 75.4 (C3¹); 65.3 (C2¹¹); 60.8 (C2¹); 35.9 (C4¹); 35.7 (C5¹); 35.3 (CH₃-N¹¹); 34.8 (CH₃-N¹); 31.2 (C3¹¹); 28.1 (*t*Bu¹¹); 20.2 (C4¹¹); 18.0 (C8¹); 17.8 (C4¹¹); 15.9 (CH₃-(C4¹)).

MS (ESI-LCQ, *m/z*):

409.2 ([M+K]⁺, 100); 393.4 ([M+Na]⁺, 20); 353.3 ([M-*t*Bu+K]⁺, 2).

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-(methyl)-valyl-(2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-*tert*-butylester (100, Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu)**



H-MeVal-MeBmt-OtBu **99** (1.30 g, 3.51 mmol) wurde in DCM (40 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach erfolgter Zugabe von 9-Fluorenylmethylsuccidimidylcarbonat (1.78 g, 5.27 mmol, 1.5 eq.) und DIEA (900 µl, 5.27 mmol, 1.5 eq.) liess man die Reaktionslösung über Nacht auf RT erwärmen. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde mit 10%iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer zum Öl eingengt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 5:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 1.73 g (2.92 mmol, 83%) des geschützten Dipeptids **100** als farblosen Schaum.

C₃₅H₄₈N₂O₆ (592.77)

R_f (Hexan / Essigester 5:2) = 0.27.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1:0.85

7.78-7.73 (*m*, 4H, H-(C7^{Fmoc})); 7.61-7.58 (*m*, 2H, H-(C4^{Fmoc}), A); 7.56-7.52 (*m*, 2H, H-(C4^{Fmoc}), B); 7.42-7.34 (*m*, 4H, H-(C6^{Fmoc})); 7.33-7.28 (*m*, 4H, H-(C5^{Fmoc})); 5.48-5.41 (*m*, 2H, H-(C7¹)); 5.39-5.32 (*m*, 2H, H-(C6¹)); 5.03 (*bs*, 1H, H-(C2¹), A); 4.93 (*bs*, 1H, H-(C2¹), B); 4.87 (*dd*, *J* = 3.5, 10.7, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.76 (*d*, *J* = 10.8, 1H, H-(C2¹¹), A); 4.71 (*dd*, *J* = 3.3, 10.7, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.46 (*m*, 2H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.25 (*t*, *J* = 6.8, 1H, H-(C2^{Fmoc}), A); 4.22 (*t*, *J* = 3.3, 1H, H-(C2^{Fmoc}), B); 3.94 (*m*, 1H, H-(C3¹), A); 3.84 (*m*, 1H, H-(C3¹), B); 3.64 (*d*, *J* = 10.8, 1H, H-(C2¹¹), B); 3.17 (*s*, 3H, CH₃-N¹, A); 2.86 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹, A); 2.64 (*s*, 3H, CH₃-N¹, B); 2.33 (*m*, 2H, H-(C3¹¹), H-(C5¹), A); 2.26 (*m*, 1H, H-(C5¹), B); 2.22 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹, B); 2.06 (*m*, 1H, H-(C3¹¹), B); 1.93 (*m*, 1H, H-(C5¹), A); 1.89 (*m*, 1H, H-(C5¹), B); 1.65 (*dd*, *J* = 1.0, 6.1, 3H, H-(C8¹), B); 1.59 (*dd*, *J* = 1.0, 6.1, 3H, H-(C8¹), A); 1.50 (*m*, 1H, H-(C4¹), A); 1.46 (*s*, 9H, *t*Bu¹, A); 1.44 (*s*, 9H, *t*Bu¹, B); 1.29 (*m*, 1H, H-(C4¹), B); 0.94 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C4¹¹), A); 0.85 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4¹¹), A); 0.79 (*d*, *J* = 6.8, 3H, CH₃-(C4¹), A); 0.71 (*d*, *J* = 6.8, 3H, CH₃-(C4¹), B); 0.47 (*d*, *J* = 6.4, 3H, H-(C4¹¹), B); 0.16 (*d*, *J* = 6.8, 3H, H-(C4¹¹), B).

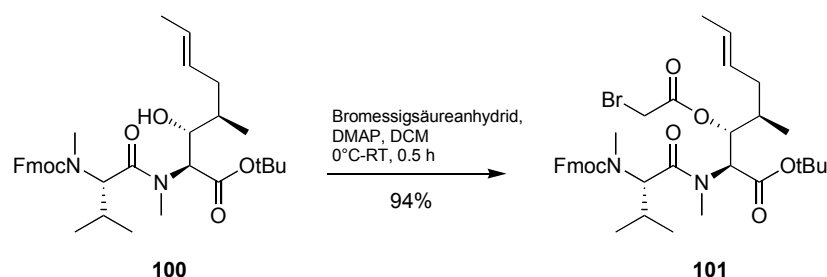
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1:0.85

171.9 (C1¹¹, A); 170.9 (C1¹¹, B); 169.4 (C1¹, A); 169.3 (C1¹, B); 156.9 (Fmoc, A); 155.7 (Fmoc, B); 144.2, 144.0, 143.9 (4C, C3^{Fmoc}); 141.7, 141.4 (4C, C8^{Fmoc}); 129.0 (C6¹, A); 128.8 (C6¹, B); 127.8, 127.7 (4C, C6^{Fmoc}); 127.5 (C7¹, B); 127.3 (C7¹, A); 127.1, 127.0 (4C, C5^{Fmoc}); 125.1, 125.0, 124.2 (4C, C4^{Fmoc}); 120.0, 119.9, 119.8 (4C, C7^{Fmoc}); 82.3 (*t*Bu¹, A); 82.1 (*t*Bu¹, B); 75.3 (C3¹, A); 75.2 (C3¹, B); 67.6 (C1^{Fmoc}, A); 66.2 (C1^{Fmoc}, B); 61.0 (C2¹, A); 60.5 (C2¹, B); 60.3 (C2¹¹, A); 60.0 (C2¹¹, B); 47.4 (C2^{Fmoc}, A); 47.2 (C2^{Fmoc}, B); 35.8 (2C, C5¹); 35.5 (2C, C4¹); 35.2 (CH₃-N¹, A); 33.5 (CH₃-N¹, B); 29.2 (CH₃-N¹¹, A); 29.1 (CH₃-N¹¹, B); 28.1 (*t*Bu¹, A); 28.0 (*t*Bu¹, B); 27.3 (C3¹¹, A); 26.7 (C3¹¹, B); 19.5 (C4¹¹, A); 19.3 (C4¹¹, B); 18.2 (C4¹¹, A); 18.0 (2C, C8¹); 16.8 (C4¹¹, B); 15.7 (CH₃-(C4¹), A); 15.5 (CH₃-(C4¹), B).

MS (ESI-MS, m/z):

615.4 ($[M+Na]^+$, 100); 559.4 ($[M-tBu+Na]^+$, 3).

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-(methyl)-valyl-(2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-3-bromacetoxyl-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (101, Fmoc-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu)**



1.60 g (2.70 mmol) des geschützten Dipeptids **100** wurden in DCM (30 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von DMAP (989 mg, 8.10 mmol, 3 eq.) wurde Bromessigsäureanhydrid (3.24 g, 8.10 mmol, 65%-Lösung in Acetonitril, 3 eq.) langsam in Portionen zugetropft. Anschliessend wurde das Eisbad entfernt und während 20 min bei RT gerührt. Die braune Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und direkt an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 6:1, auftragen in DCM) gereinigt. Man erhielt 1.81 g (2.54 mmol, 94%) des gewünschten Bromacetates **101** als farblosen Schaum.

C₃₇H₄₉BrN₂O₇ (713.70)

R_f (Hexan / Essigester 5:2) = 0.37.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1:1

7.78-7.75 (*m*, 4H, H-(C7^{Fmoc})); 7.61-7.55 (*m*, 4H, H-(C4^{Fmoc})); 7.42-7.38 (*m*, 4H, H-(C6^{Fmoc})); 7.35-7.29 (*m*, 4H, H-(C5^{Fmoc})); 5.64 (*d*, *J* = 4.6, 1H, H-(C2¹), A); 5.46 (*dd*, *J* = 4.8, 8.6, 1H, H-(C3¹), A); 5.46 (*d*, *J* = 4.4, 1H, H-(C2¹), B); 5.43-5.33 (*m*, 2H, H-(C7¹)); 5.34 (*dd*, *J* = 4.6, 8.8, 1H, H-(C3¹), B); 5.28-5.17 (*m*, 2H, H-(C6¹)); 4.91 (*dd*, *J* = 3.6, 10.7, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.83 (*d*, *J* = 10.9, 1H, H-(C2¹¹), A); 4.74 (*dd*, *J* =

3.2, 10.7, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.50 (*dd*, *J* = 6.9, 10.6, 1H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.40 (*dd*, *J* = 6.9, 10.7, 1H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.25 (*t*, *J* = 6.8, 1H, H-(C2^{Fmoc}), A); 4.23 (*t*, *J* = 3.3, 1H, H-(C2^{Fmoc}), B); 3.79 (*d*, *J* = 12.4, 1H, H-(C^{Br})); 3.77 (*d*, *J* = 11.9, 1H, H-(C^{Br})); 3.76 (*d*, *J* = 12.4, 1H, H-(C^{Br})); 3.75 (*d*, *J* = 11.9, 1H, H-(C^{Br})); 3.72 (*d*, *J* = 10.7, 1H, H-(C2¹¹), B); 3.22 (*s*, 3H, CH₃-N¹, A); 2.87 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹, A); 2.65 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹, B); 2.32 (*m*, 1H, H-(C3¹¹), A); 2.19 (*s*, 3H, CH₃-N¹, B); 2.10-1.98 (*m*, 2H, H-(C5¹)); 2.04 (*m*, 1H, H-(C3¹¹), B); 1.81-1.67 (*m*, 2H, H-(C5¹)); 1.66 (*m*, 1H, H-(C4¹), A); 1.64 (*dd*, *J* = 1.3, 6.3, 3H, H-(C8¹)); 1.51 (*dd*, *J* = 1.3, 6.4, 3H, H-(C8¹)); 1.44 (*m*, 1H, H-(C4¹), B); 1.43 (*s*, 9H, *t*Bu¹, A); 1.41 (*s*, 9H, *t*Bu¹, B); 0.96 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C4¹¹), A); 0.87 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4¹¹), A); 0.81 (*d*, *J* = 6.7, 3H, CH₃-(C4¹), A); 0.75 (*d*, *J* = 6.8, 3H, CH₃-(C4¹), B); 0.48 (*d*, *J* = 6.4, 3H, H-(C4¹¹), B); 0.22 (*d*, *J* = 6.8, 3H, H-(C4¹¹), B).

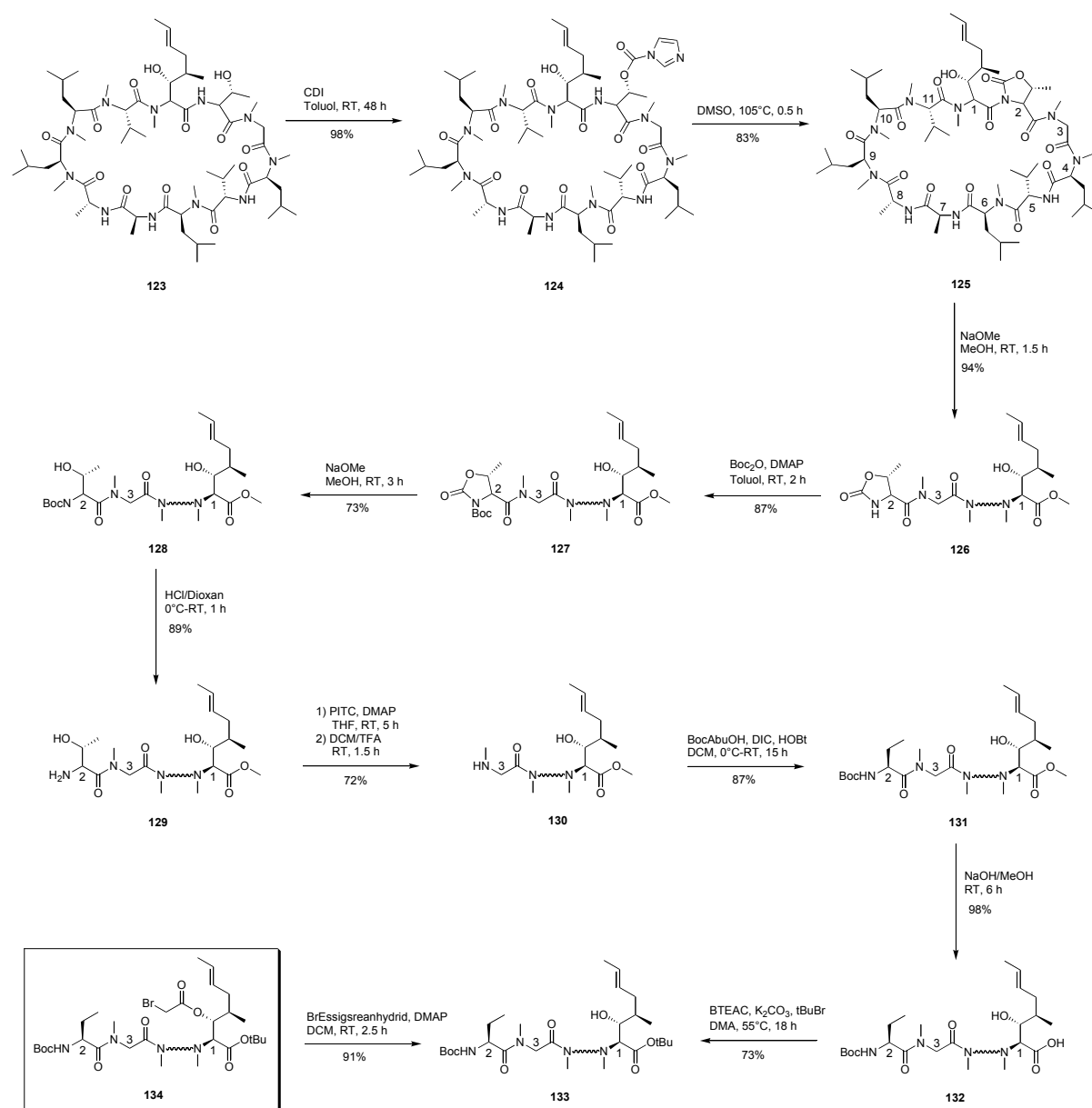
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1:1

172.2 (C1¹¹, A); 171.2 (C1¹¹, B); 167.5 (C1¹, A); 167.4 (C1¹, B); 165.8, 165.7 (2C, C^{Br}); 157.0 (Fmoc, A); 155.8 (Fmoc, B); 144.2, 143.9, 143.8 (4C, C3^{Fmoc}); 141.8, 141.4 (4C, C8^{Fmoc}); 128.5 (2C, C6¹); 127.8 (4C, C6^{Fmoc}); 127.5 (C7¹, B); 127.3 (2C, C5^{Fmoc}); 127.2 (C7¹, A); 127.1 (2C, C5^{Fmoc}); 125.0, 124.9, 124.2, 124.1 (4C, C4^{Fmoc}); 120.0, 119.9 (4C, C7^{Fmoc}); 82.8 (*t*Bu¹, A); 82.5 (*t*Bu¹, A); 78.2 (C3¹, A); 78.0 (C3¹, B); 67.7 (C1^{Fmoc}, A); 66.1 (C1^{Fmoc}, B); 59.6 (C2¹¹, A); 59.4 (C2¹¹, B); 57.2 (C2¹, A); 57.0 (C2¹, B); 47.3 (C2^{Fmoc}, A); 47.2 (C2^{Fmoc}, B); 35.3, 35.2 (2C, C5¹); 35.0 (C4¹, A); 34.8 (C4¹, B); 33.8 (CH₃-N¹, A); 32.2 (CH₃-N¹, B); 29.2 (CH₃-N¹¹, A); 29.1 (CH₃-N¹¹, B); 28.0 (*t*Bu¹, A); 27.9 (*t*Bu¹, B); 27.5 (C3¹¹, A); 26.9 (C3¹¹, B); 25.5 (2C, C^{Br}); 19.4 (C4¹¹, A); 19.2 (C4¹¹, B); 18.4 (C4¹¹, A); 18.0, 17.9 (2C, C8¹); 17.1 (C4¹¹, B); 15.5 (2C, CH₃-(C4¹)).

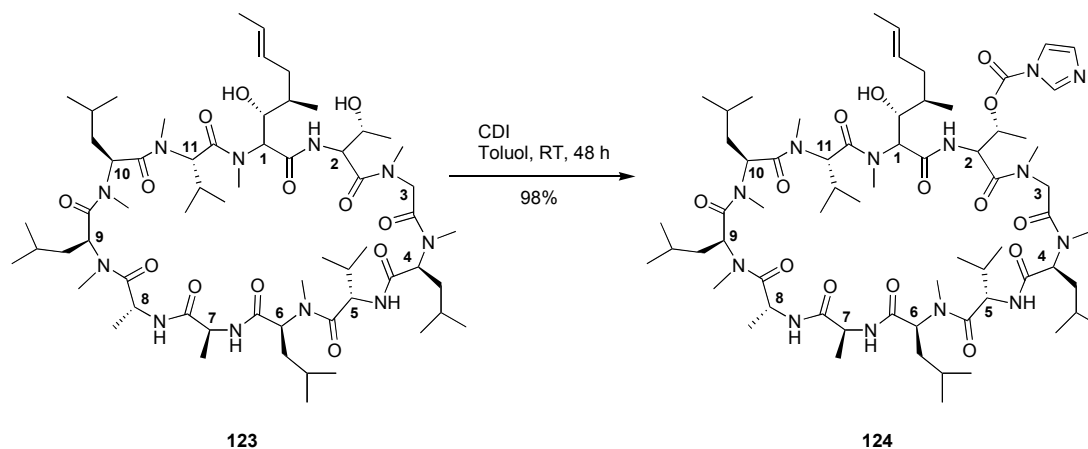
MS (ESI-MS, m/z):

737.3 ([M+Na]⁺, 100); 735.4 ([M+Na]⁺, 93); 681.3 ([M-*t*Bu+Na]⁺, 8); 679.3 ([M-*t*Bu+Na]⁺, 8).

11.4 Synthese des linearen Undecapeptids Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (134)



Schema 36 Synthese des linearen Undecapeptids **134** als Vorläufer für die Cyclisierung an der Festphase

[Thr²-carbonyl imidazol] CsC (124)

1.22 g (1.00 mmol) CsC (**123**) wurden in Toluol (15 ml) gelöst. Nach der Zugabe von CDI (244 mg, 1.50 mmol, 1.5 eq.) wurde 48 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung in einen Scheidetrichter überführt und mit Wasser (2 x) und mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach mehrmaligem Koevaprieren mit DCM erhielt man 1.29 g (0.98 mmol, 98%) des am Thr² aktivierten CsC **124** als weissen Feststoff.

C₆₆H₁₁₃N₁₃O₁₄ (1312.68)

R_f (Aceton) = 0.51.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

7.96 (*t*, *J* = 1.0, 1H, H-(C^{Im})); 7.68 (*d*, *J* = 9.7, 1H, HN²); 7.35 (*d*, *J* = 7.7, 1H, HN⁵); 7.27 (*t*, *J* = 1.5, 1H, H-(C^{Im})); 7.17 (*d*, *J* = 7.1, 1H, HN⁷); 6.98 (*d*, *J* = 7.7, 1H, HN⁸); 6.96 (*dd*, *J* = 0.7, 1.5, 1H, H-(C^{Im})); 5.64 (*dd*, *J* = 4.5, 11.0, 1H, H-(C2⁹)); 5.60 (*d*, *J* = 5.3, 1H, H-(C2¹)); 5.40 (*t*, *J* = 9.6, 1H, H-(C2²)); 5.37-5.30 (*m*, 2H, H-(C6¹), H-(C7¹)); 5.27 (*dd*, *J* = 4.0, 11.7, 1H, H-(C2⁴)); 5.22 (*q**d*, *J* = 6.2, 9.3, 1H, H-(C3²)); 5.12 (*d*, *J* = 11.1, 1H, H-(C2¹¹)); 5.04 (*dd*, *J* = 5.2, 9.0, 1H, H-(C2¹⁰)); 4.89 (*dd*, *J* = 6.3, 9.4, 1H, H-(C2⁶)); 4.77 (*d*, *J* = 14.0, 1H, H-(C2³)); 4.75 (*q*, *J* = 7.5, 1H, H-(C2⁸)); 4.62 (*d*, *J* = 7.0, 1H, HO-(C3¹)); 4.50 (*dd*, *J* = 7.7, 10.3, 1H, H-(C2⁵)); 4.40

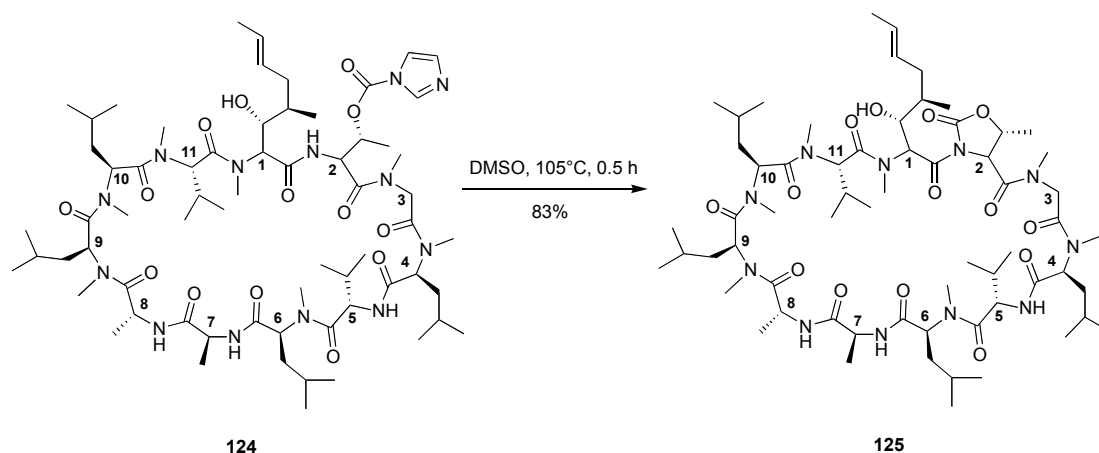
(*q*, *J* = 7.3, 1H, H-(C2⁷)); 3.81 (*ddd*, *J* = 1.5, 7.0, 12.3, 1H, H-(C3¹)); 3.49 (*s*, 3H, CH₃-N¹); 3.42 (*s*, 3H, CH₃-N³); 3.28 (*d*, *J* = 14.1, 1H, H-(C2³)); 3.24 (*s*, 3H, CH₃-N⁶); 3.11 (*s*, 3H, CH₃-N⁴); 3.03 (*s*, 3H, CH₃-N⁹); 2.67 (*s*, 3H, CH₃-N¹⁰); 2.61 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹); 2.46 (*m*, 1H, H-(C5¹)); 2.34 (*m*, 1H, H-(C3⁵)); 2.17 (*ddd*, *J* = 5.0, 9.0, 13.7, 1H, H-(C3¹⁰)); 2.06 (*ddd*, *J* = 3.2, 11.2, 13.9, 1H, H-(C3⁹)); 1.98 (*m*, 2H, H-(C3⁴), H-(C3¹¹)); 1.96 (*m*, 1H, H-(C3⁶)); 1.65 (*m*, 2H, H-(C5¹), H-(C4⁶)); 1.62 (*m*, 1H, H-(C3⁴)); 1.61 (*d*, *J* = 5.6, 3H, H-(C8¹)); 1.58 (*m*, 1H, H-(C4¹)); 1.48 (*m*, 1H, H-(C4¹⁰)); 1.42 (*m*, 1H, H-(C4⁴)); 1.39 (*d*, *J* = 6.2, 3H, H-(C4²)); 1.30 (*m*, 1H, H-(C4⁹)); 1.25 (*m*, 1H, H-(C3⁹)); 1.21 (*d*, *J* = 6.8, 3H, H-(C3⁸)); 1.10 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C4⁵)); 1.09 (*m*, 1H, H-(C3¹⁰)); 1.02 (*d*, *J* = 7.3, 3H, H-(C3⁷)); 0.99 (*d*, *J* = 6.6, 6H, H-(C5¹⁰)); 0.96 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C4¹¹)); 0.94 (*d*, *J* = 6.0, 6H, H-(C5⁴), H-(C5⁹)); 0.92 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C4⁵)); 0.88 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C5⁶)); 0.86 (*d*, *J* = 6.5, 6H, H-(C5⁶), H-(C5⁹)); 0.85 (*d*, *J* = 6.4, 3H, H-(C5⁴)); 0.80 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C4¹¹)); 0.63 (*d*, *J* = 6.6, 3H, CH₃-(C4¹)).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

174.0 (C1⁵); 173.3 (C1¹¹); 173.2 (C1⁸); 171.8 (C1¹); 171.5 (C1²); 171.1 (2C, C1³, C1⁶); 170.9 (C1⁷); 170.0 (2C, C1⁴, C1⁹); 169.7 (C1¹⁰); 148.1 (C^{Im}); 137.0 (C^{Im}); 130.5 (C^{Im}); 129.4 (C6¹); 126.4 (C7¹); 117.1 (C^{Im}); 75.3 (C3¹); 74.5 (C3²); 59.2 (C2¹); 57.5 (2C, C2¹⁰, C2¹¹); 55.9 (C2⁵); 55.8 (C2⁴); 55.3 (C2⁶); 51.6 (C2²); 50.6 (C2³); 48.9 (C2⁷); 48.4 (C2⁹); 45.4 (C2⁸); 41.1 (C3¹⁰); 39.8 (CH₃-N³); 38.9 (C3⁹); 37.4 (C3⁶); 36.9 (C4¹); 36.3 (C5¹); 35.8 (C3⁴); 34.7 (CH₃-N¹); 31.5 (CH₃-N⁶); 31.4 (CH₃-N⁴); 30.9 (C3⁵); 29.7 (CH₃-N¹⁰); 29.5 (CH₃-N⁹); 29.3 (CH₃-N¹¹); 28.6 (C3¹¹); 25.7 (C4⁶); 24.8 (C4⁴); 24.7 (C4¹⁰); 24.6 (C4⁹); 23.9 (C5¹⁰); 23.8 (C5⁶); 23.6 (C5⁴); 23.4 (C5⁹); 22.9 (C5¹⁰); 22.7 (C5⁶); 21.8 (C5⁹); 20.9 (C5⁴); 20.0 (C4¹¹); 19.9 (C4⁵); 18.7 (C4¹¹); 18.3 (2C, C3⁸, C4⁵); 18.0 (C8¹); 17.0 (CH₃-C3²); 16.3 (CH₃-C4¹); 15.5 (C3⁷).

MS (ESI-MS, m/z):

1335.0 ([M+Na]⁺, 100); 1312.8 ([M+H]⁺, 5).

[Thr²-oxazolidinon] CsC (125)

1.27 g (0.97 mmol) des aktivierten CsC **124** wurden in DMSO (15 ml) gelöst und während 30 Minuten im vorgeheizten Ölbad bei 105°C gerührt. Nach der Abkühlung der Lösung auf RT wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser auf 250 ml verdünnt und in einen Scheidetrichter überführt. Anschliessend wurde mit Diethylether (3 x 200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Essigester) chromatographisch gereinigt. Es wurden 995 mg (0.80 mmol, 83%) des cyclisierten Produktes **125** als weisser Schaum erhalten.

$\text{C}_{63}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$ (1244.61)

R_f (Essigester) = 0.32.

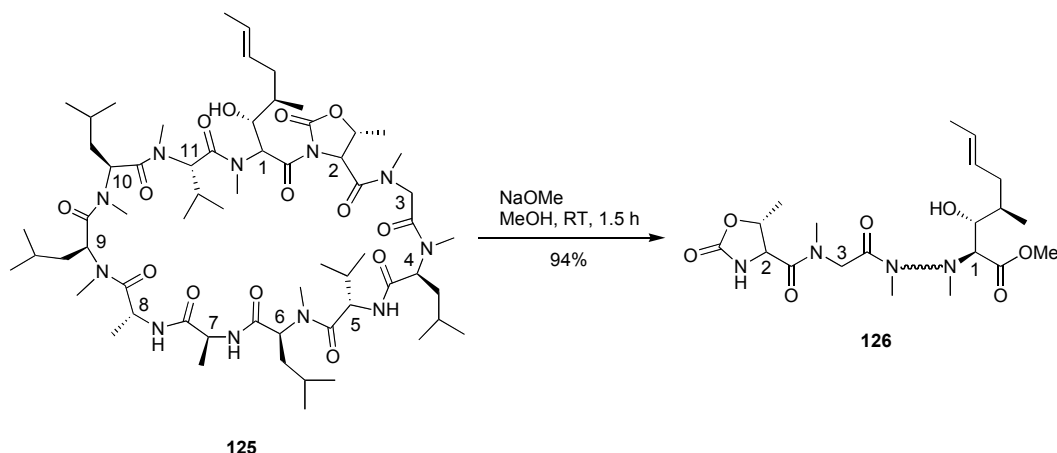
¹H-NMR / ¹³C-NMR:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1266.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1244.8 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 3).

H-Thr²-oxazolidion-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OMe (126)



950 mg (0.76 mmol) des bicyclischen CsC **125** wurden in MeOH (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von Natriummethanolat (2.28 ml, 0.5 M Lösung, 1.14 mmol, 1.5 eq.) wurde 90 min bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Lösung mit Essigester und Wasser (150ml) in einen Scheidetrichter überführt. Nach der Extraktion mit Essigester (2 x 100 ml) wurden die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, DCM / MeOH 12:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 910 mg (0.71 mmol, 94%) des linearen Undecapeptids **126** als weissen Schaum.

$C_{64}H_{113}N_{11}O_{15}$ (1276.65)

R_f (DCM / MeOH 12:1) = 0.25.

¹H-NMR / ¹³C-NMR:

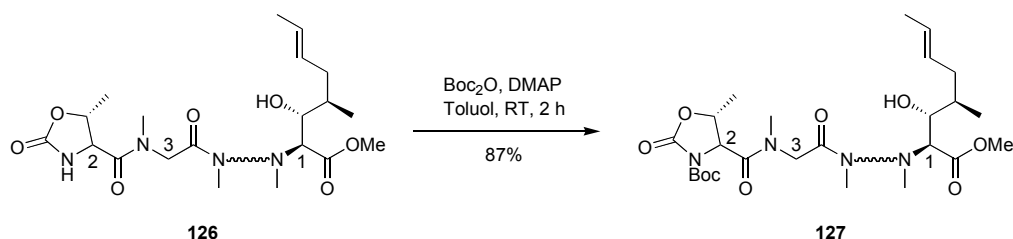
Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1299.2 ($[M+Na]^+$, 100).

1274.7 ($[M-H]^+$, 100).

Boc-Thr²-oxazolidion-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OMe (127)



885 mg (0.69 mmol) des linearen Undeca-peptids **126** wurden in Toluol (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von DMAP (110 mg, 0.90 mmol, 1.3 eq.) und einer Lösung von Boc_2O (175 mg, 0.80 mmol, 1.2 eq.) in Toluol (5 ml) wurde 2 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Lösung mit Essigester in einen Scheidetrichter überführt und mit Wasser (120 ml) verdünnt. Danach wurde mit 1N Schwefelsäurelösung auf einen pH-Wert ~ 3 angesäuert und mit Essigester (2 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der erhaltene gelbliche Schaum wurde an Kieselgel (Uetikon, DCM / MeOH 10:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 826 mg (0.60 mmol, 87%) des vollständig geschützten linearen Undeca-peptids **127** als weissen Schaum.

$\text{C}_{69}\text{H}_{121}\text{N}_{11}\text{O}_{17}$ (1376.76)

R_f (DCM / MeOH 10:1) = 0.28.

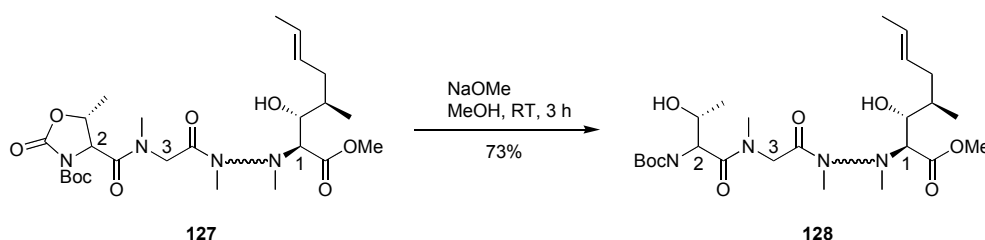
¹H-NMR / ¹³C-NMR:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1399.2 ($[M+Na]^+$, 100); 1299.2 ($[M-Boc+Na]^+$, 3).

Boc-Thr-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OMe (128)



800 mg (0.58 mmol) des linearen Undecapeptids **127** wurden in MeOH (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von Natriummethanolat (1.40 ml, 0.5 M Lsg., 0.70 mmol, 1.2 eq.) wurde 3 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Lösung mit Essigester und Wasser (150ml) in einen Scheidetrichter überführt. Nach der Extraktion mit Essigester (2 x 100 ml) wurden die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, DCM / MeOH 20:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 572 mg (0.42 mmol, 73%) des geschützten linearen Undecapeptids **128** von CsC als weissen Schaum.

$C_{68}H_{123}N_{11}O_{16}$ (1350.77)

R_f (DCM / MeOH 20:1) = 0.27.

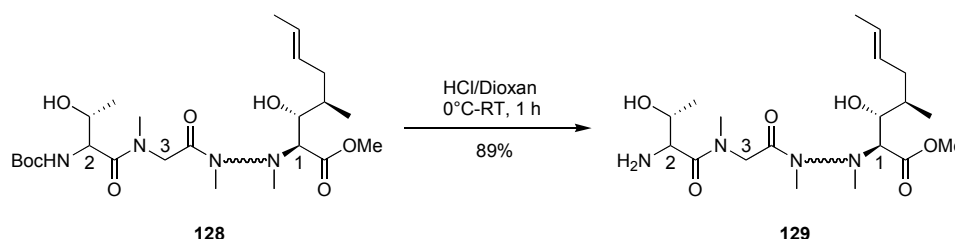
 $^1\text{H-NMR}$ / $^{13}\text{C-NMR}$:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1372.9 ($[M+Na]^+$, 100).

H-Thr-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OMe
(129)



500 mg (0.37 mmol) des linearen Undeca-peptids **128** wurden mit einem vorgekühlten Gemisch aus HCl in Dioxan (10 ml, 4 N Lösung, 40 mmol) umgesetzt. Nach 10 min Rühren im Eisbad und anschliessender 60 min Reaktionszeit bei RT wurde die überschüssige HCl am Wasserstrahlvakuum entfernt. Die restliche Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und danach mit Essigester (100ml) in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung gewaschen (3 x 100 ml), über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach mehrmaligem Koevaprieren mit DCM erhielt man 412 mg (0.33 mmol, 89%) des entschützten Peptids **129** als weissen Schaum.

$\text{C}_{63}\text{H}_{115}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$ (1250.66)

R_f (DCM / MeOH 10:1) = 0.20.

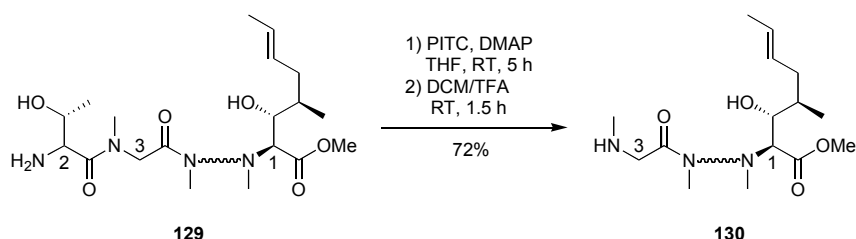
$^1\text{H-NMR}$ / $^{13}\text{C-NMR}$:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1272.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1250.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 83) .

H-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OMe
(130)



390 mg (0.31 mmol) des entschützten Undeca-peptids **129** wurden in THF (6 ml) gelöst. Nach der Zugabe von DMAP (38 mg, 0.31 mmol, 1 eq.) und Phenylisothiocyanat (74 μ l, 0.62 mmol, 2 eq.) wurde 5 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt an Kieselgel (Uetikon, DCM / MeOH 20:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 301 mg (0.22 mmol, 70%) des für den Edman-Abbau aktivierten Zwischenproduktes als gelblichen Schaum. Dieses Zwischenprodukt wurde anschliessend in DCM (10 ml) gelöst und im Eisbad gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (1 ml) wurde das Eisbad entfernt und 90 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschliessend am Rotationsverdampfer eingengt und mehrmals mit Toluol und DCM ko-evaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, DCM / MeOH 10:1) chromatographisch gereinigt und man erhielt 214 mg (0.19 mmol, 85%) des um eine Aminosäure verkürzten Peptids **131** als weissen Schaum.

Das erhaltene Produkt entspricht der freundlicherweise von der Firma Novartis als Referenz zur Verfügung gestellten Substanz WR 4123-HAT.

$\text{C}_{59}\text{H}_{108}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$ (1149.55)

$R_f(\text{DCM} / \text{MeOH } 10:1) = 0.23.$

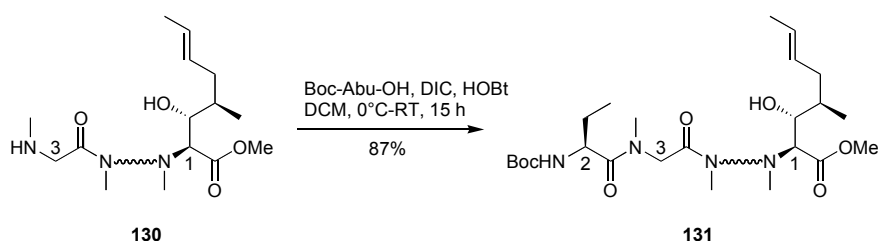
¹H-NMR / ¹³C-NMR:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1163.7 ([M+Na]⁺, 76); 1149.9 ([M+H]⁺, 100) .

Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OMe (131)



1.15 g (1.00 mmol) des Decapeptids **130** wurden in DCM (10 ml) gelöst und im Eisbad gekühlt. In einem zweiten Kolben wurden Boc-Abu-OH (407 mg, 2.00 mmol, 2 eq.) und HOBT (270 mg, 2.00 mmol, 2 eq.) in DCM (10ml) gelöst und im Eisbad mit DIC (310 μ l, 2.00 mmol, 2 eq.) versetzt. Schon nach kurzer Zeit konnte durch Trübung der Lösung die Bildung des Harnstoffs nachgewiesen werden. Nach 20 min wurde die beiden Lösungen vereint und danach während 3 h bei RT gerührt. Anschliessend wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Aceton 3:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 1.16 g (0.87 mmol, 87%) des Undeapeptids **131** als weissen Schaum.

C₆₈H₁₂₃N₁₁O₁₅ (1334.77)

R_f (Hexan / Aceton 1:1) = 0.36.

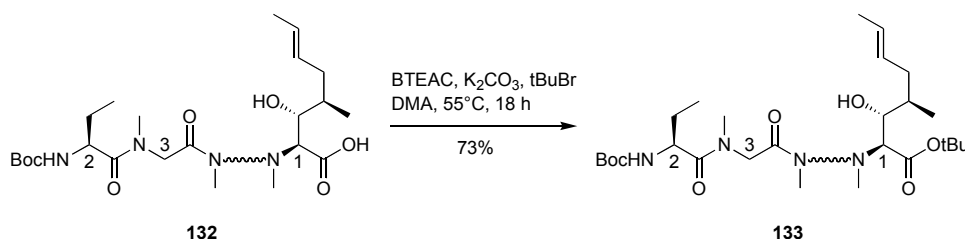
$^1\text{H-NMR}$ / $^{13}\text{C-NMR}$:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1343.0 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100).

1319.1 ($[\text{M}-\text{H}]^+$, 100).

Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (133)

Das entschützte Undecapeptid **132** (870 mg, 0.66 mmol) wurde zusammen mit Kaliumcarbonat (2.36 g, 17.1 mmol, 26 eq.) und Benzyltriethyl-ammoniumchlorid (515 mg, 0.66 mmol, 1 eq.) in Dimethylacetamid (35 ml) gelöst. Nach der Zugabe von *tert*-Butylbromid (3.56 ml, 31.6 mmol, 48 eq.) wurde die Reaktionslösung auf 55°C erwärmt und über Nacht gerührt. Die entstandene weisse Suspension wurde auf RT abgekühlt, und anschliessend mit Wasser und Essigester in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde mit 10%iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und erneut am Rotationsverdampfer zum Öl eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Aceton 2:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 661 mg (0.48 mmol, 73%) des vollständig geschützten linearen Undecapeptids von CsA **133** als weissen Schaum.

$\text{C}_{71}\text{H}_{129}\text{N}_{11}\text{O}_{15}$ (1376.85)

R_f (DCM / MeOH 20:1) = 0.41.

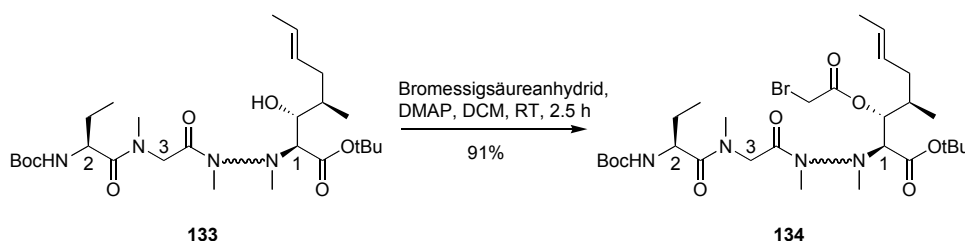
$^1\text{H-NMR}$ / $^{13}\text{C-NMR}$:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1399.0 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1376.7 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 10).

Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(COCH₂Br)-OtBu (134)



Undecapeptid **133** (555 mg, 0.40 mmol) wurde in DCM (10 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von DMAP (148 mg, 1.21 mmol, 3 eq.) wurde Bromessigsäureanhydrid (484 mg, 65%-Lösung in Acetonitril, 1.21 mmol, 3 eq.) langsam in Portionen zugetropft. Anschliessend wurde das Eisbad entfernt und während 2.5 h bei RT gerührt. Die braune Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und direkt an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Aceton 3:1, Auftragen in DCM) gereinigt. Man erhielt 550 mg (0.37 mmol, 91%) des gewünschten Bromacetates **134** als weissen Schaum.

$\text{C}_{73}\text{H}_{130}\text{BrN}_{11}\text{O}_{16}$ (1497.78)

R_f (DCM / MeOH 30:1) = 0.26.

^1H -NMR / ^{13}C -NMR:

Aufgrund der Ausbildung einer Vielzahl von Rotameren und der daraus resultierenden Komplexität der Spektren konnte eine sinnvolle NMR-Auswertung nicht durchgeführt werden.

MS (ESI-MS, m/z):

1520.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100).

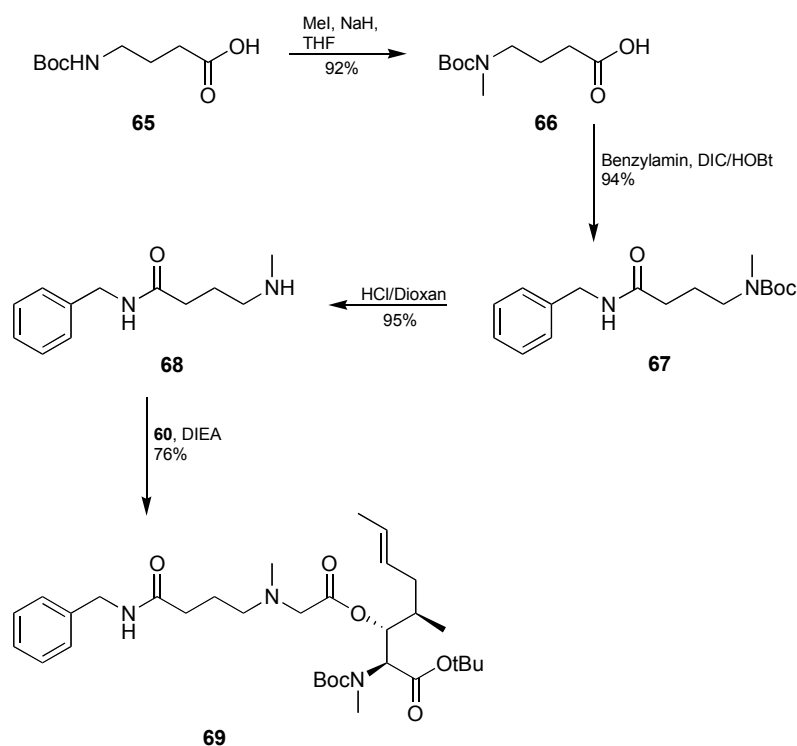
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

169.8 (C1); 168.5 (C1'); 156.5 (Boc); 138.4 (ipsoC^{Ar}); 129.0, 128.9, 128.3, 127.2, 127.0 (7C, C^{Ar}, C6, C7); 82.1 (tBu¹); 80.4 (tBu^{Boc}); 76.3 (C3); 61.0 (C4'); 59.0 (C2); 57.3 (C2'); 42.3 (CH₃-N3'); 35.1 (C5); 34.8 (CH₃-N); 32.5 (C4); 28.3 (tBu¹); 27.9 (tBu^{Boc}); 17.9 (C8); 15.6 (CH₃-(C4)).

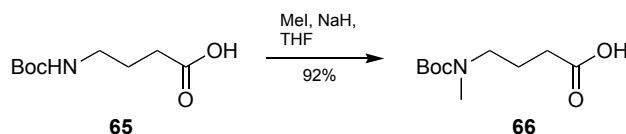
MS (ESI-MS, m/z):

541.3 ([M+Na]⁺, 100); 485.4 ([M-tBu+Na]⁺, 2).

12.2 Synthese von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-[(3-benzylcarbamoyl-propyl)-methyl-aminoacetoxyl]-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (69)



Schema 37 *Synthese des Linkermodells 69*

N-(tert-Butoxycarbonyl)-N-(methyl)-4-aminobuttersäure (66)

N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-aminobuttersäure (2.92 g, 14.4 mmol) und Methyljodid (7.22 ml, 115 mmol, 8 eq.) wurden in THF (50 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der vorsichtigen Zugabe von NaH (2.30 g, 60%-Dispersion, 57.5 mmol, 4 eq.) wurde unter Rühren über Nacht auf RT erwärmt. Anschliessend wurde vorsichtig Wasser zugegeben, um den noch vorhandenen Überschuss an NaH zu vernichten. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit Wasser in einen Scheidetrichter überführt und mit Ether (150 ml) gewaschen. Danach wurde die wässrige Phase mit 4N HCl auf pH~3 angesäuert und anschliessend zweimal mit Essigester (je 150 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mit Wasser, Thiosulfatlösung, Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 2.87 g (13.2 mmol, 92%) der N-methylierten Ausgangsverbindung **66** als farbloses Öl, welches im Kühlschrank auskristallisierte.

C₁₀H₁₉NO₄ (217.26)

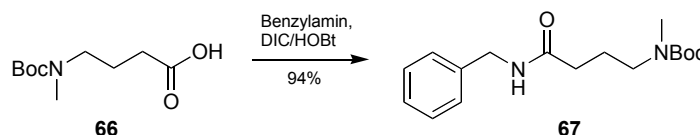
R_f (Hexan / Essigester / Essigsäure 30:10:1) = 0.39.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

3.28 (*bt*, *J* = 6.7, 2H, H-(C2)); 2.85 (*s*, 3H, CH₃-N); 2.36 (*t*, *J* = 7.3, 2H, H-(C4)); 1.85 (*tt*, *J* = 7.1, 2H, H-(C3)); 1.45 (*s*, 3H, *t*Bu).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

178.7 (C1); 156.4 (Boc); 80.1 (*t*Bu); 48.3 (C4); 34.4 (CH₃-N); 31.3 (C2); 28.7 (*t*Bu); 23.2 (C3).

MS (ESI-MS, m/z):240.1 ($[M+Na]^+$, 100); 184.1 ($[M-tBu+Na]^+$, 5).216.1 ($[M-H]^-$, 100).**N-(tert-Butoxycarbonyl)-N-(methyl)-4-aminobuttersäurebenzylamid (67)**

N-(tert-Butoxycarbonyl)-N-(methyl)-4-aminobuttersäure (**66**) (300 mg, 1.38 mmol) wurde in DCM (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von HOBT (224 mg, 1.66 mmol, 1.2 eq.) und DIC (214 μ l, 1.38 mmol 1.0 eq.) liess man 20 min bei RT rühren. Es bildete sich ein weisser Niederschlag (Harnstoff), der durch einen Spritzenfilter abgetrennt wurde. Anschliessend wurde Benzylamin (150 μ l, 1.38 mmol, 1.0 eq.) zugetropft. Nach 4 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingengt und an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 1:1) gereinigt. Man erhielt 397 mg (1.30 mmol, 94%) des Benzylamids **67** als farbloses Öl.

 $C_{17}H_{26}N_2O_3$ (306.40) R_f (Essigester) = 0.39. **1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):**

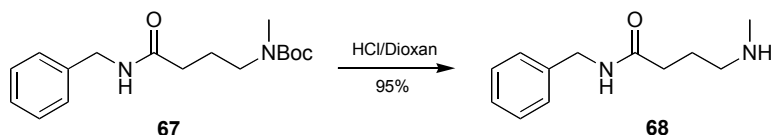
7.34-7.24 (*m*, 5H, $H-(C^{Ar})$); 6.92 (*bs*, 1H, HN); 4.43 (*d*, $J = 5.8$, 2H, CH_2-C^{Ar}); 3.26 (*bt*, $J = 6.7$, 2H, $H-(C2)$); 2.83 (*s*, 3H, CH_3-N); 2.19 (*t*, $J = 7.1$, 2H, $H-(C4)$); 1.86 (*quint*, $J = 7.1$, 2H, $H-(C3)$); 1.44 (*s*, 3H, *t*Bu).

 ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

172.5 ($C1$); 155.6 (Boc); 138.4 ($ipso C^{Ar}$); 128.5, 127.6, 127.1 (C^{Ar}); 79.5 (*t*Bu); 47.2 ($C4$); 43.4 (CH_2-C^{Ar}); 34.0 (CH_3-N); 33.3 ($C2$); 28.3 (*t*Bu); 23.8 ($C3$).

MS (ESI-MS, m/z):

329.1 ($[M+Na]^+$, 100); 273.3 ($[M-tBu+Na]^+$, 2).

N-(Methyl)-4-aminobuttersäurebenzylamid (68)

307 mg des Benzylamids **67** (1.00 mmol) wurden mit einem vorgekühlten Gemisch von HCl in Dioxan (8 ml, 4N Lsg., 32 mmol, 32 eq.,) zur Reaktion gebracht. Nach 1 h Rühren bei RT wurde am Wasserstrahlvakuum die überschüssige Salzsäure entfernt und anschliessend am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, DCM / MeOH / TEA 10:1:1) unter gleichzeitiger Freisetzung des Amins chromatographisch gereinigt. Man erhielt 195 mg (0.95 mmol, 95%) des am Aminoende entschützten Spacers **68** als farbloses Öl.

$C_{12}H_{18}N_2O$ (206.28)

R_f (Essigester / TEA 0.5%) = 0.36.

 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):

7.34-7.24 (*m*, 5H, H-C^{Ar}); 6.71 (*bs*, 1H, HN^{Ar}); 4.43 (*d*, $J = 5.6$, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}^{\text{Ar}}$); 2.63 (*t*, $J = 6.7$, 2H, H-C(4)); 2.36 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 2.32 (*t*, $J = 7.1$, 2H, H-C(2)); 2.13 (*bs*, 1H, HN); 1.86 (*quint*, $J = 7.0$, 2H, H-C(3)).

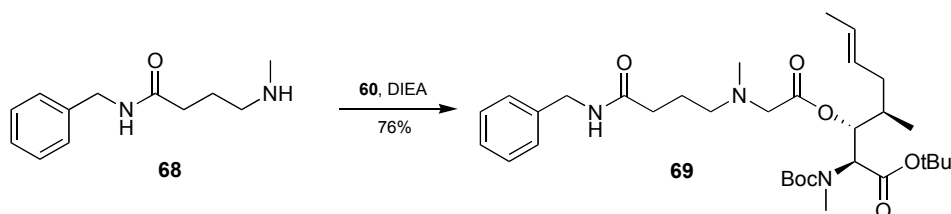
 $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):

172.6 (C1); 138.5 ($\text{ipso C}^{\text{Ar}}$); 128.6, 127.7, 127.3 (C^{Ar}); 50.7 (C4); 43.5 ($\text{CH}_2\text{-C}^{\text{Ar}}$); 35.6 ($\text{CH}_3\text{-N}$); 34.3 (C2); 24.9 (C3).

MS (ESI-MS, m/z):

207.1 ($[M+H]^+$, 100).

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-3-[(3-Benzylcarbamoyl-propyl)-methylaminoacetoxyl]-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-*tert*-butylester (69)**



Die Bromacetoxxyverbindung von Boc-MeBmt-OtBu **60** (100 mg, 0.21 mmol) wurde in DCM (10 ml) gelöst. Nach der Zugabe von *N*-(Methyl)-4-aminobuttersäurebenzylamid (**68**) (66 mg, 0.32 mmol, 1.5 eq.) und DIEA (55 μ l, 0.32 mmol, 1.5 eq.) wurde über Nacht bei RT gerührt. Anschliessend wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Aceton 4:1 \rightarrow 1:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 96 mg (0.16 mmol, 76%) des Linkermodells **69** als farbloses Öl.

$C_{33}H_{53}N_3O_7$ (603.79)

R_f (Hexan / Aceton 2:1) = 0.28.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.33-7.23 (*m*, 5H, H-(C^{Ar}); 6.73, 6.66 (2*bs*, 1H, HN8'); 5.47-5.32 (*m*, 3H, H-(C3), H-(C6), H-(C7)); 5.12 (*d*, $J = 5.3$, 1H, H-(C2)); 4.44 (*dd*, $J = 5.8, 14.5$, 1H, H-(C9')); 4.40 (*dd*, $J = 5.8, 14.7$, 1H, H-(C9')); 3.16 (*d*, $J = 16.9$, 1H, H-(C2')); 3.09 (*d*, $J = 17.2$, 1H, H-(C2')); 2.87 (*s*, 3H, CH₃-N); 2.48 (*t*, $J = 6.4$, 2H, H-(C4')); 2.31 (*bt*, $J = 6.3$, 2H, H-(C6')); 2.24 (*s*, 3H, CH₃-(N3')); 2.09 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.80 (*quint*, $J = 6.8$, 2H, H-(C5')); 1.80-1.68 (*m*, 2H, H-(C4), H-(C5)); 1.64 (*d*, $J = 5.8$, 3H, H-(C8)); 1.45 (*s*, 9H, *t*Bu); 1.42 (*s*, 9H, *t*Bu); 0.89 (*d*, $J = 6.3$, 3H, CH₃-(C4)).

^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

172.9 (C7'); 169.9 (C1); 168.6 (C1'); 156.4 (Boc); 138.8 (ipsoC^{Ar}); 128.8, 128.5, 127.9, 127.3, 127.1 (7C, C^{Ar} , C6, C7); 82.1 ($t\text{Bu}^1$); 80.4 ($t\text{Bu}^{\text{Boc}}$); 76.4 (C3); 58.9 (C2); 58.2 (C2'); 56.0 (C4'); 43.5 (C9'); 42.1 ($\text{CH}_3\text{-N3'}$); 35.1 (C5); 35.0 ($\text{CH}_3\text{-N}$); 34.3 (C6'); 32.5 (C4); 28.3 ($t\text{Bu}^1$); 27.9 ($t\text{Bu}^{\text{Boc}}$); 23.3 (C5'); 17.9 (C8); 15.6 ($\text{CH}_3\text{-(C4)}$)).

MS (ESI-MS, m/z):

626.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 604.5 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 19).

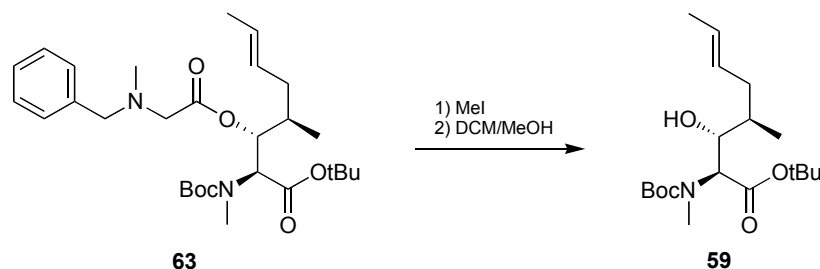
13 Spaltung der Modellverbindungen in homogener Phase

13.1 Aktivierung und Spaltung von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-benzylmethylaminoacetoxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (63)

Die Abspaltung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) erfolgte in zwei Stufen: Aktivierung durch Methylierung und Freisetzung.

Methylierung: 50 mg (96 µmol) der Modellverbindung **63** wurden mit 5 mL Methyljodid versetzt. Nach 3 Stunden Rühren bei RT wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mit DCM koevaporiert (3 x). Anschliessend wurde am HV getrocknet. Man erhielt 48 mg (90 µmol, 94%) des gewünschten quaternären Ammoniumsalzes als gelblichen Schaum. Nach der Kontrolle der Masse durch ESI-MS wurde das Produkt ohne weitere Reinigung zur Abspaltung eingesetzt.

Freisetzung: Die Spaltung des Linkers wurde in verschiedenen Gemischen von DCM und MeOH ausgetestet. Nach der exakten Einwaage des quaternären Ammoniumsalzes und des internen Standards wurde das LM-Gemisch zugegeben. Die Quantifizierung der Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) erfolgte durch regelmässige Probenentnahme, Bestimmung der Menge an Boc-MeBmt-OtBu durch HPLC-Chromatogramme und Flächenfaktoren. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Ohne vorgängige Aktivierung durch Methylierung erfolgte keine Spaltung der Modellschubstanz.



Spatlösung	Menge 63*	Ausbeute	Reaktionszeit
DCM	6.23 mg	0.0 mg (0%)	48 h
DCM / MeOH 3:1	5.83 mg	2.67 mg (85%)	24 h
DCM / MeOH 1:1	5.60 mg	3.15 mg (100%)	24 h
MeOH	5.82 mg	2.85 mg (90%)	24 h

63* = quaternäres Ammoniumsalz

Tabelle 20 Ausbeuten der Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) aus der Modellverbindung **63**

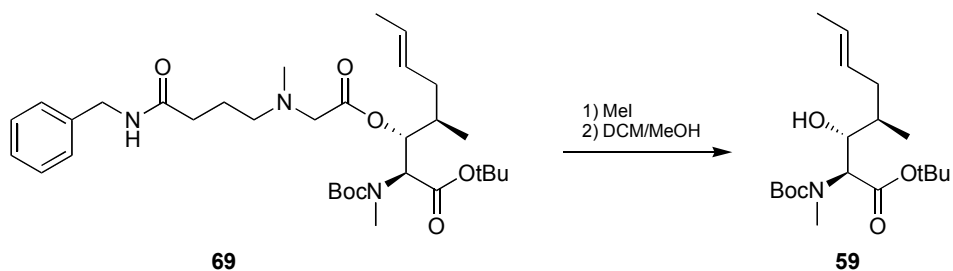
13.2 Aktivierung und Spaltung von von N-(tert-Butoxycarbonyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-[(3-Benzylcarbamoyle-propyl)-methylaminoacetoxyl]-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (69)

Die Abspaltung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) erfolgte in zwei Stufen: Aktivierung durch Methylierung und Freisetzung.

Methylierung: 100 mg (166 μmol) der Modellverbindung **69** wurden mit 10 mL Methyljodid versetzt. Nach 3 Stunden Rühren bei RT wurde am Rotationsverdampfer eingengt und mit DCM ko-evaporiert (3 x). Anschliessend wurde am HV getrocknet. Man erhielt 99 mg (160 μmol , 97%) des gewünschten quaternären Ammoniumsalzes als gelblichen Schaum. Nach der Kontrolle der Masse durch ESI-MS wurde das Produkt ohne weitere Reinigung zur Abspaltung eingesetzt.

Freisetzung: Die Spaltung des Linkers wurde in verschiedenen Gemischen von DCM und MeOH ausgetestet. Nach der exakten Einwaage des quaternären Ammoniumsalzes und des internen Standards wurde das LM-Gemisch zugegeben. Die Quantifizierung der Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) erfolgte durch

regelmässige Probenentnahme, Bestimmung der Menge an Boc-MeBmt-OtBu durch HPLC-Chromatogramme und Flächenfaktoren. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Ohne vorgängige Aktivierung durch Methylierung erfolgte keine Spaltung der Modellschubstanz.



Spatlösung	Menge 69*	Ausbeute	Reaktionszeit
DCM	4.56 mg	0.0 mg (0%)	24 h
DCM / MeOH 3:1	4.86 mg	2.23 mg (95%)	24 h
DCM / MeOH 1:1	4.85 mg	2.00 mg (86%)	24 h
MeOH	5.85 mg	2.45 mg (88%)	24 h

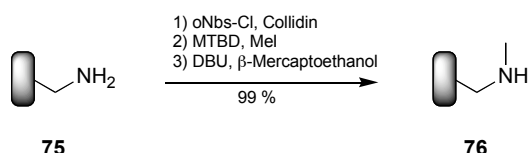
69* = quaternäres Ammoniumsalz

Tabelle 21 Ausbeuten der Freisetzung von Boc-MeBmt-OtBu (**59**) aus der Modellverbindung **69**

14 Beladung der Laternen

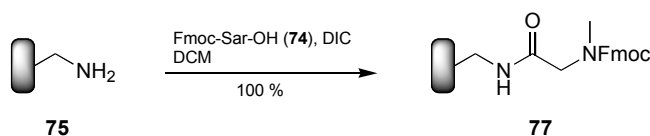
14.1 Derivatisierung der eingesetzten Laternen

Synthese von N-methylierten Laternen (76, Typ I)



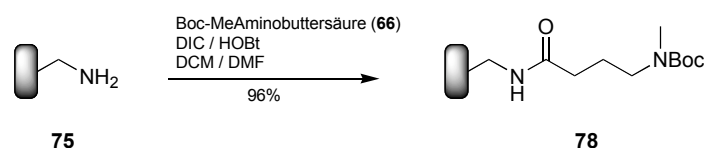
20 Mimotopes-Laternen des Typs AMM (~0.74 mmol) wurden nach **AAV1** zum freien Amin umgesetzt. Anschliessend wurde mit einer Lösung an oNbs-Cl (492 mg, 2.22 mmol, 3 eq.) und Collidin (491 μ l, 3.70 mmol, 5 eq.) in DCM (15 ml) 2 h bei RT geschüttelt. Nach der Aufarbeitung nach **AAV4** wurden die Laternen mit MTBD (319 μ l, 2.22 mmol, 3 eq.) und MeI (186 μ l, 2.96 mmol, 4 eq.) in DMF (15 ml) versetzt. Die Reaktionslösung wurde nach 2 h entfernt und die Laternen 5 mal mit DMF (15 ml, 3 min) gewaschen. Die Laternen wurden danach mit Essigsäureanhydrid (5 ml) in DCM (10 ml) behandelt und erneut nach **AAV4** aufgearbeitet. Anschliessend wurden die Laternen mit DBU (553 μ l, 3.70 mmol, 5 eq.) und β-Mercaptoethanol (519 μ l, 7.40 mmol, 10 eq.) in DMF (15 ml) zur Reaktion gebracht. Die Lösung verfärbte sich dabei gelblich. Nach 2 h Schütteln bei RT wurden die Laternen 5 mal mit DMF (15 ml, 3 min) gewaschen und anschliessend nach **AAV4** gereinigt. Die Beladungsbestimmung erfolgte nach **BBV2** und ergab einen Wert von 36.7 μ mol (99%).

Synthese von Fmoc-Sarcosyl-Laternen (77, Typ II)



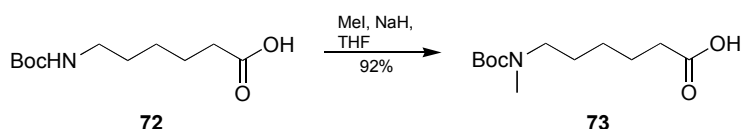
10 Mimotopes-Laternen des Typs AMM (~ 0.37 mmol) wurden nach **AAV1** zum freien Amin umgesetzt. Anschliessend wurden die Laternen mit Fmoc-Sarcosin (**74**, 1.25g, 4.00 mmol) und DIC (310 μ l, 2.00 mmol) in DCM (10 ml) über Nacht (15 h) zur Reaktion gebracht. Danach wurden die Laternen mit DCM und DMF (je 3 x, 10 ml, 3 min) gewaschen, mit Essigsäureanhydrid (3 ml) in DCM (7 ml) acetyliert und nach **AAV4** aufgearbeitet. Die Beladungsbestimmung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 37.0 μ mol (100%).

Synthese von Boc-MeAminobuttersäure-Laternen (78, Typ III)



10 Mimotopes-Laternen des Typs AMM (~ 0.37 mmol) wurden nach **AAV1** zum freien Amin umgesetzt. Anschliessend wurden die Laternen mit einer bereits vorher hergestellten Lösung aus dem Buttersäurespacer **66** (435 mg, 2.00 mmol), HOBt (324 mg, 2.40 mmol) und DIC (310 μ l, 2.00 mmol) in DCM / DMF (7:3, 10 ml) über Nacht (15 h) zur Reaktion gebracht. Danach wurden die Laternen mit DCM und DMF (je 3 x, 10 ml, 3 min) gewaschen, mit Essigsäureanhydrid (3 ml) in DCM (7 ml) acetyliert und nach **AAV4** aufgearbeitet. Die Beladungsbestimmung erfolgte nach **BBV2** und ergab einen Wert von 35.4 μ mol (96%).

Synthese von N-(tert-Butoxycarbonyl)-N-(methyl)-6-amino-capronsäure (73)



N-(tert-Butoxycarbonyl)-6-aminocapronsäure (**72**, 4.00 g, 17.3 mmol) und Methyljodid (8.70 ml, 138 mmol, 8 eq.) wurden in THF (150 ml, frisch destilliert) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der vorsichtigen Zugabe von NaH

(2.77 g, 60%-Dispersion, 69.2 mmol, 4 eq.) wurde unter Rühren über Nacht auf RT erwärmt. Anschliessend wurde vorsichtig Wasser zugegeben, um den noch vorhandenen Überschuss an NaH zu vernichten. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt, mit Wasser in einen Scheidetrichter überführt und mit Ether (200 ml) gewaschen. Danach wurde die wässrige Phase mit 4N HCl auf pH~3 angesäuert und anschliessend zweimal mit Essigester (je 150 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mit Wasser, Thiosulfatlösung (2 x), Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 4.05 g (16.5 mmol, 95%) der N-methylierten Aminocaprinsäure **73** als farbloses Öl.

$C_{12}H_{23}NO_4$ (245.32)

R_f (Hexan / Essigester / Essigsäure 30:10:1) = 0.25.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

3.20 (*bt*, $J = 7.0$, 2H, H-(C2)); 2.83 (*s*, 3H, CH_3 -N); 2.36 (*t*, $J = 7.3$, 2H, H-(C6)); 1.66 (*tt*, $J = 7.3, 7.8$, 2H, H-(C3)); 1.53 (*tt*, $J = 7.3, 7.6$, 2H, H-(C3)); 1.45 (*s*, 3H, *t*Bu); 1.33 (*tt*, $J = 7.3, 8.5$, 2H, H-(C4)).

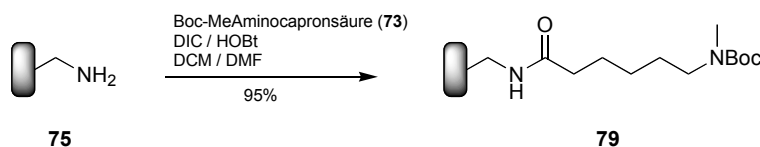
^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

179.0 (C1); 155.9 (Boc); 79.3 (*t*Bu); 48.3 (C2); 34.1 (CH_3 -N); 33.9 (C); 28.4 (*t*Bu); 27.5 (C); 26.1 (C); 24.4 (C).

MS (ESI-MS, m/z):

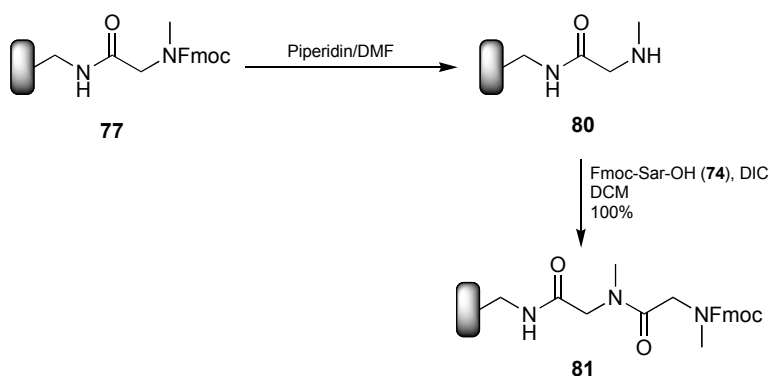
268.2 ($[M+Na]^+$, 100); 212.2 ($[M-tBu+Na]^+$, 5).
244.3 ($[M-H]^-$, 100).

Synthese von Boc-MeAminocapronsäure-Laternen (79, Typ IV)



20 Mimotopes-Laternen des Typs AMM (~ 0.74 mmol) wurden nach **AAV1** zum freien Amin umgesetzt. Anschliessend wurden die Laternen mit einer bereits vorher hergestellten Lösung aus dem Hexansäurespacer **73** (736 mg, 3.00 mmol), HOBT (486 mg, 3.60 mmol) und DIC (467 μl , 3.00 mmol) in DCM / DMF (7:3, 15 ml) über Nacht (15 h) zur Reaktion gebracht. Danach wurden die Laternen mit DCM und DMF (je 3 x, 10 ml, 3 min) gewaschen, mit Essigsäureanhydrid (3 ml) in DCM (7 ml) acetyliert und nach **AAV4** aufgearbeitet. Die Beladungsbestimmung erfolgte nach **BBV2** und ergab einen Wert von 35.2 μmol (95%).

Synthese von Fmoc-Sarcosyl-Sarcosyl-Laternen (81, Typ V)

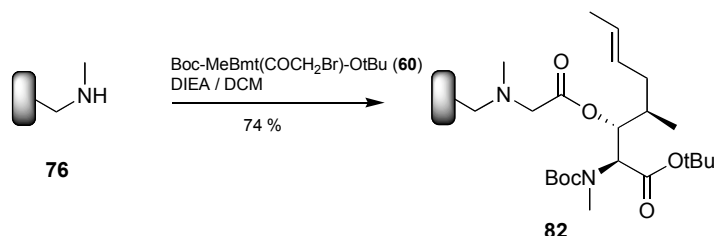


5 Fmoc-Sarcosyl-Laternen (**77**) wurden nach **AAV2** zum freien Amin (Fmoc-Abspaltung) umgesetzt. Anschliessend wurden die Laternen mit Fmoc-Sarcosin (623 mg, 2.00 mmol) und DIC (155 μl , 1.00 mmol) in DCM (5 ml) über Nacht (15 h) zur Reaktion gebracht. Danach wurden die Laternen mit DCM und DMF (je 3 x, 10 ml, 3 min) gewaschen, mit Essigsäureanhydrid (3 ml) in DCM (7 ml) acetyliert und nach **AAV4** aufgearbeitet. Die Beladungsbestimmung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 37.0 μmol (100%).

14.2 Beladung der derivatisierten Laternen

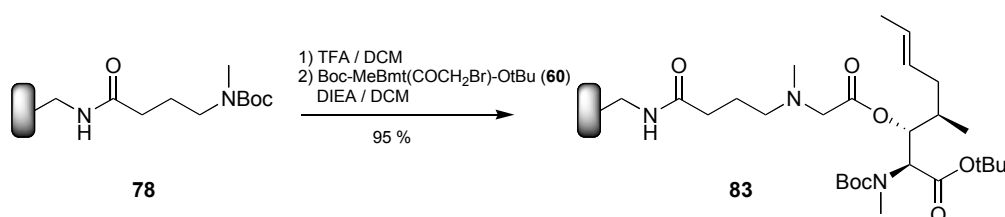
14.2.1 Beladung mit Boc-MeBmt-OtBu

Beladung der Laternen Typ I



5 Laternen des Typs I **76** (0.18 mmol) wurden mit einer Lösung aus der Bromacetoxy-Verbindung von Boc-MeBmt-OtBu **60** (383 mg, 0.80 mmol) und DIEA (86 μ l, 0.50 mmol) in DCM (4 ml) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei RT wurde das Reaktionsgemisch entfernt und die Laternen mit DCM (5 x, 5 ml) gewaschen. Anschliessend wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV2** und ergab einen Wert von 27.1 μ mol (74%).

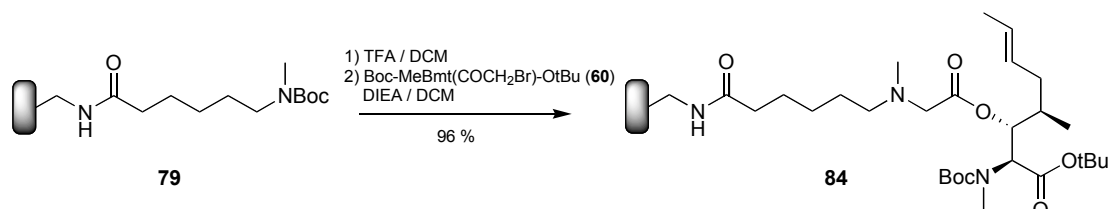
Beladung der Laternen Typ III



5 Laternen des Typs III **78** (0.18 mmol) wurden nach **AAV3** am Aminende debocyliert und mit einer Lösung aus der Bromacetoxy-Verbindung von Boc-MeBmt-OtBu **60** (383 mg, 0.80 mmol) und DIEA (86 μ l, 0.50 mmol) in DCM (4 ml) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei RT wurde das Reaktionsgemisch entfernt und die Laternen mit DCM (5 x, 5 ml) gewaschen. Anschliessend wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert,

und danach die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV2** und ergab einen Wert von 33.5 μmol (95%).

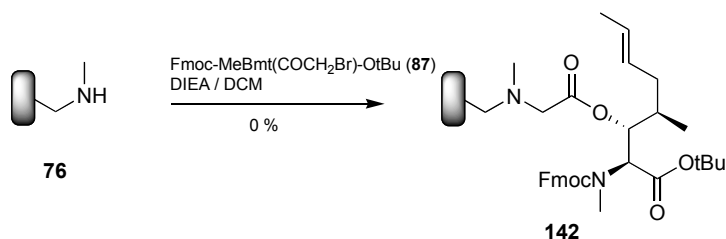
Beladung der Laternen Typ IV



10 Laternen des Typs IV **79** (0.35 mmol) wurden nach **AAV3** am Aminende entschützt und mit einer Lösung aus der Bromacetoxy-Verbindung von Boc-MeBmt-OtBu **60** (766 mg, 1.60 mmol) und DIEA (172 μl , 1.00 mmol) in DCM (8 ml) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei RT wurde das Reaktionsgemisch entfernt und die Laternen mit DCM (5 x, 10 ml) gewaschen. Anschliessend wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (3 ml) in DCM (7 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV2** und ergab einen Wert von 33.8 μmol (96%).

14.2.2 Beladung mit Fmoc-MeBmt-OtBu

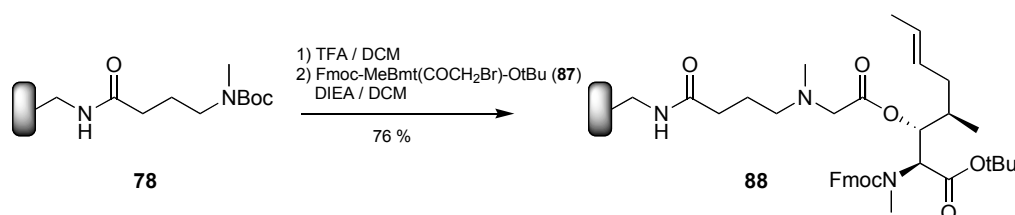
Beladung der Laternen Typ I



5 Laternen des Typs I **76** (0.18 mmol) wurden mit einer Lösung aus der Bromacetoxy-Verbindung von Fmoc-MeBmt-OtBu **87** (480 mg, 0.80 mmol) und DIEA (86 μl , 0.50 mmol) in DCM (4 ml) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei RT wurde das Reaktionsgemisch entfernt und die Laternen mit DCM (5 x, 5 ml) gewaschen.

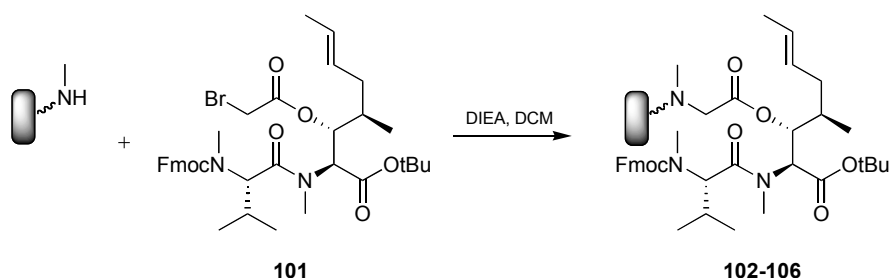
Anschliessend wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 0 μmol (0%).

Beladung der Laternen Typ III

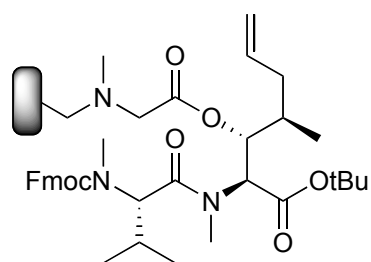


5 Laternen des Typs III **78** (0.18 mmol) wurden nach **AAV3** am Aminende debocyliert und mit einer Lösung aus der Bromacetoxy-Verbindung von Fmoc-MeBmt-OtBu **87** (480 mg, 0.80 mmol) und DIEA (86 μl , 0.50 mmol) in DCM (4 ml) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei RT wurde das Reaktionsgemisch entfernt (Edukt wurde zurückgewonnen) und die Laternen mit DCM (5 x, 5 ml) gewaschen. Anschliessend wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 26.9 μmol (76%).

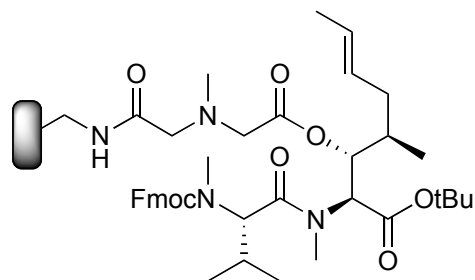
14.2.3 Beladung mit Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu



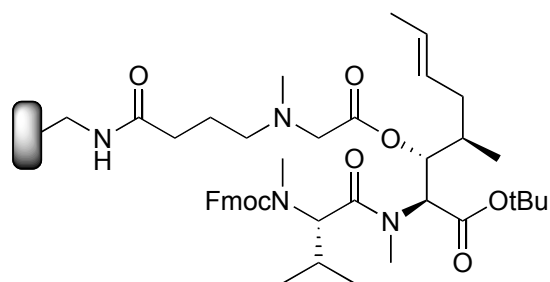
Die Laternen (Typ I-V) wurden analog der Beladungen mit Boc-MeBmt-OtBu und Fmoc-MeBmt-OtBu entschützt (Laternen Typ III und IV Boc-, Laternen Typ II und V Fmoc-) und anschliessend mit einer 0.2 M Lösung von Fmoc-MeValMeBmt(COCH₂Br)-OtBu in DCM mit DIEA 15 h bei RT geschüttelt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung entfernt und die Laternen mit DCM 5 Mal gewaschen. Nicht abreagierte Amine der Laternen wurden danach mit einer Lösung von Essigsäureanhydrid in DCM 30 min acetyliert. Zum Schluss wurden die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die auf den einzelnen Laternentypen I-V erhaltenen Beladungen wurden mittels **BBV1** bestimmt und ergaben die nachfolgenden Beladungswerte:

**102**

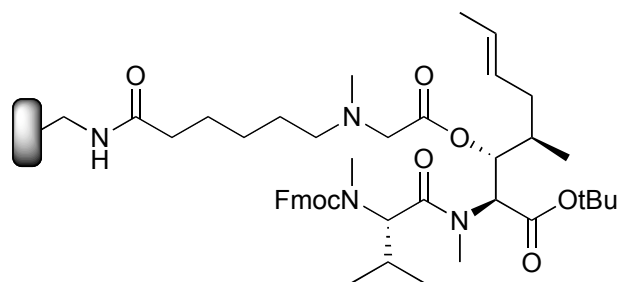
Laternentyp I

Beladung: 7.9 μmol (22%)Grundbeladung: 36.7 μmol **103**

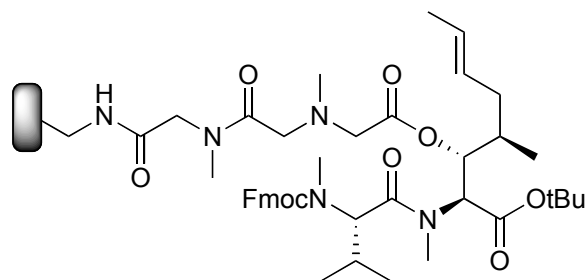
Laternentyp II

Beladung: 28.6 μmol (77%)Grundbeladung: 37.0 μmol **104**

Laternentyp III

Beladung: 29.2 μmol (82%)Grundbeladung: 35.4 μmol **105**

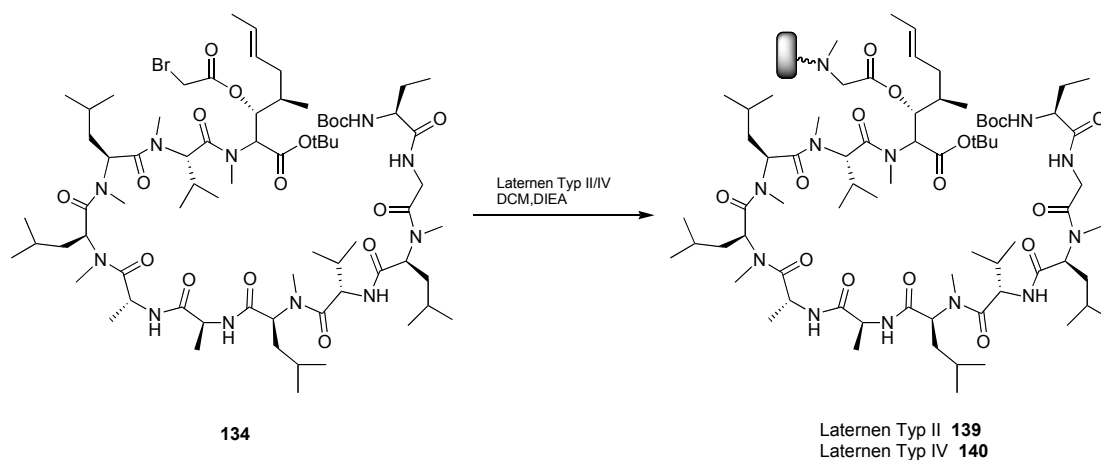
Laternentyp IV

Beladung: 30.7 μmol (87%)Grundbeladung: 35.2 μmol **106**

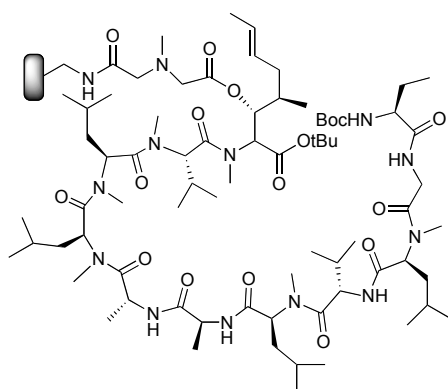
Laternentyp V

Beladung: 34.0 μmol (92%)Grundbeladung: 37.0 μmol

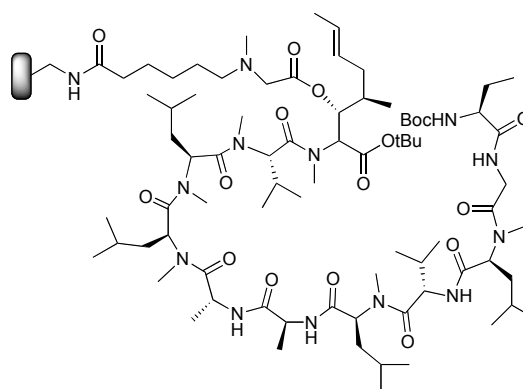
14.2.4 Beladung mit linearem Undecapeptid



Die Laternen (Typ II und IV) wurden am Aminende entschützt (Typ II Fmoc- und Typ IV Boc-) und anschliessend mit einer 0.2 M Lösung des linearen Undecapeptids **134** in DCM mit DIEA (0.4 M) 15 h bei RT versetzt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung entfernt und die Laternen mit DCM 5 Mal gewaschen. Nicht abreagierte Amine der Laternen wurden danach mit einer Lösung von Essigsäureanhydrid in DCM 30 min acetyliert. Zum Schluss wurden die Laternen nach **AAV4** gewaschen. Die auf den Laternentypen II und IV erhaltenen Beladungen wurden mittels **BBV2** bestimmt und ergaben die nachfolgenden Beladungswerte:



139
Laternen Typ II
Beladung: 6.8 μmol (18%)
Grundbeladung: 37.0 μmol

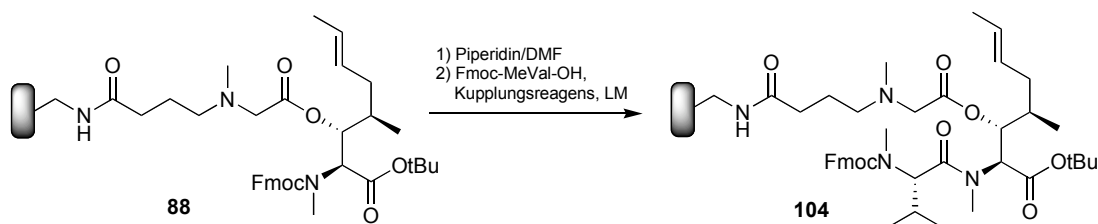


140
Laternen Typ IV
Beladung: 14.8 μmol (42%)
Grundbeladung: 35.2 μmol

15 Aufbau der Peptidkette

15.1 Synthese von Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Dipeptid)

15.1.1 Direkte Synthese durch Kupplung von Fmoc-MeVal-OH



Ausgehend von mit Fmoc-MeBmt-OtBu beladenen Laternen des Typs III **88** wurde mit verschiedenen Kupplungsreagenzien und Lösungsmitteln die Kupplung von Fmoc-MeVal-OH untersucht.

Kupplung mit DIC/DCM

2 Laternen Fmoc-MeBmt(®)-OtBu Typ III **88** (53.8 μmol) wurden nach **AAV2** mit Piperidin/DMF entschützt. Danach wurden die Laternen mit einer vorbereiteten Lösung aus Fmoc-MeVal-OH (382 mg, 1.08 mmol, 20 eq.), DIC (84 μl , 0.54 mmol, 10 eq.) und DCM (5 ml) versetzt. Nach 5 h Reaktionszeit bei RT wurde die Lösung entfernt, und die Laternen mit DCM (5 x, 5 ml, 3 min) gewaschen. Anschliessend wurde über Nacht (15 h) mit den gleichen Bedingungen eine zweite Kupplungsreaktion durchgeführt. Danach wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 5 mL) gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 1.6 μmol (6%).

Kupplung mit DIC/HOAt/DCM

2 Laternen Fmoc-MeBmt(®)-OtBu Typ III **88** (53.8 μmol) wurden nach **AAV2** mit Piperidin/DMF entschützt. Danach wurden die Laternen mit einer vorbereiteten Lösung aus Fmoc-MeVal-OH (382 mg, 1.08 mmol, 20 eq.), HOAt (147 mg, 1.08 mmol, 20 eq.), DIC (168 μl , 1.08 mmol, 20 eq.) und DMF (5 ml) versetzt. Nach 5 h Reaktionszeit bei RT wurde die Lösung entfernt, und die Laternen mit DMF (5 x, 5 ml, 3 min) gewaschen. Anschliessend wurde über Nacht (15 h) mit den gleichen Bedingungen eine zweite Kupplungsreaktion durchgeführt. Danach wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 5 mL) gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 4.3 μmol (16%).

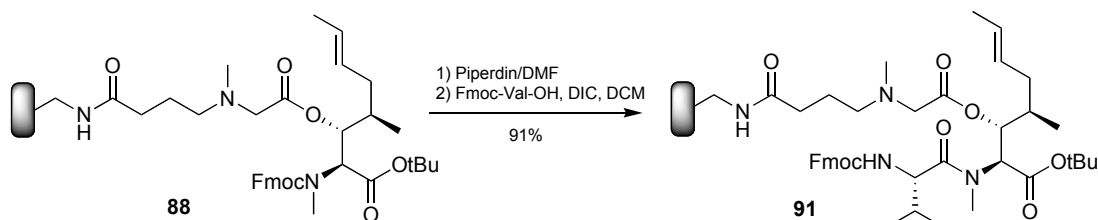
Kupplung mit DIC/HOAt/NMP

2 Laternen Fmoc-MeBmt(®)-OtBu Typ III **88** (53.8 μmol) wurden nach **AAV2** mit Piperidin/DMF entschützt. Danach wurden die Laternen mit einer vorbereiteten Lösung aus Fmoc-MeVal-OH (382 mg, 1.08 mmol, 20 eq.), HOAt (147 mg, 1.08 mmol, 20 eq.), DIC (168 μl , 1.08 mmol, 20 eq.) und NMP (5 ml) versetzt. Nach 5 h Reaktionszeit bei RT wurde die Lösung entfernt, und die Laternen mit NMP (5 x, 5 ml, 3 min) gewaschen. Anschliessend wurde über Nacht (15 h) mit den gleichen Bedingungen eine zweite Kupplungsreaktion durchgeführt. Danach wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 5 mL) gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 7.8 μmol (29%).

Die Kupplungsreaktion unter Verwendung der gleichen Vorschrift wie oben, jedoch nur mit der um 50% tieferen Konzentration an Fmoc-MeVal-Aktivester (10 eq. in 5 ml NMP) ergab nach **BBV1** eine Beladung von 6.5 μmol (24%).

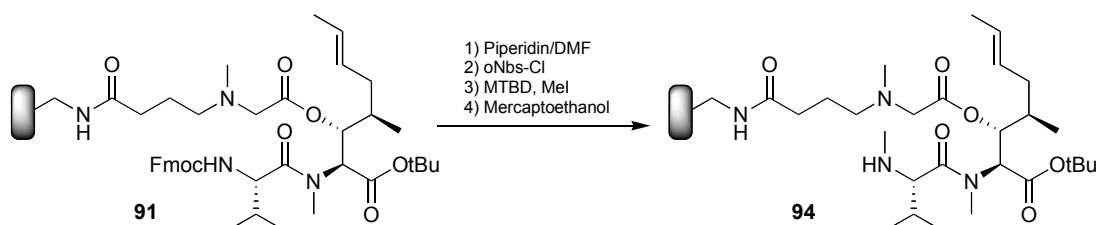
15.1.2 Indirekte Synthese durch Kupplung von Fmoc-Val-OH und anschliessende N-Methylierung an der Festphase

Kupplung von Fmoc-Val-OH



2 Laternen Fmoc-MeBmt(®)-OtBu Typ III **88** (53.8 μmol) wurden nach **AAV2** mit Piperidin/DMF entschützt. Danach wurden die Laternen mit einer vorbereiteten Lösung aus Fmoc-Val-OH (367 mg, 1.08 mmol, 20 eq.), DIC (84 μl , 0.54 mmol, 10 eq.) und DCM (5 ml) versetzt. Nach 5 h Reaktionszeit bei RT wurde die Lösung entfernt, und die Laternen mit DCM (5 x, 5 ml, 3 min) gewaschen. Anschliessend wurde über Nacht (15 h) mit den gleichen Bedingungen eine zweite Kupplungsreaktion durchgeführt. Danach wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und danach die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 5 mL) gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 24.5 μmol (91%).

N-Methylierung von Fmoc-Val-MeBmt(®)-OtBu an der Festphase

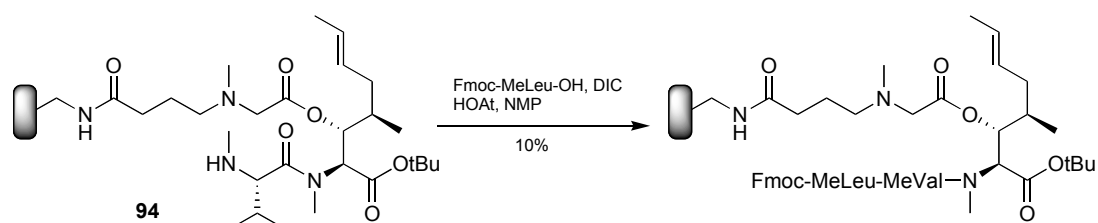


2 Laternen Fmoc-Val-MeBmt(®)OtBu (49.0 μmol) wurden nach **AAV2** entschützt und anschliessend mit einer Lösung aus oNbs-Cl (33 mg, 0.15 mmol, 3 eq.), sym. Collidin (33 μl , 0.25 mmol, 5 eq.) und DCM (5 ml) umgesetzt. Nach 3 h Schütteln bei RT wurde die Reaktionslösung entfernt, und die Laternen mit DCM und DMF (je 3 x,

5 ml, 3 min) gewaschen. Danach wurden die Laternen mit MTBD (22 μ l, 0.15 mmol, 3 eq.) und MeI (6 μ l, 74 μ mol, 1.5 eq.) in DMF (5 ml) versetzt. Nach 1 h Reaktionszeit bei RT wurde die Lösung entfernt, die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 5 ml, 3 min) gewaschen, und die nicht abreagierten Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (2 ml) acetyliert. Dem anschliessenden Waschgang mit DCM und DMF (je 3 x, 5 ml, 3 min) folgte die Abspaltung der oNbs-Gruppe in einer Lösung aus DBU (38 μ l, 0.30 mmol, 5 eq.), β -Mercaptoethanol (36 μ l, 0.50 mmol, 3 eq.) und DMF (5 ml). Nach 2 h Schütteln bei RT wurde die Reaktionslösung entfernt, und die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 5 mL, 3 min) gewaschen. Die Laternen wurden ohne Bestimmung der Beladung direkt weiter zur Kupplung mit Fmoc-MeLeu-OH eingesetzt.

15.2 Synthese von Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Tripeptid)

15.2.1 Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH auf ein an der Festphase aufgebautes Dipeptid



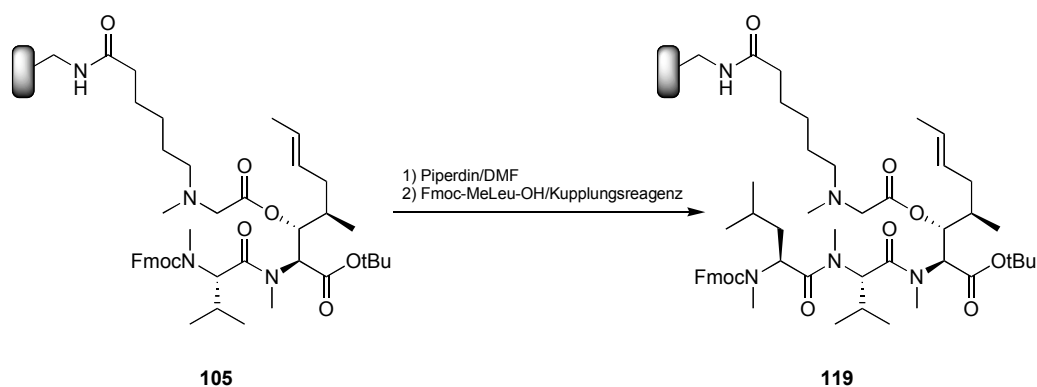
2 Laternen H-MeVal-MeBmt(®)-OtBu **94** wurden mit einer vorgefertigten Lösung aus Fmoc-MeLeu-OH (184 mg, 0.49 mmol, 10 eq.), HOAt (67 mg, 0.49 mmol, 10 eq.), DIC (76 μ l, 0.49 mmol, 10 eq.) und NMP (5 ml) zum Tripeptid gekuppelt. Nach 5 h Reaktionszeit bei 60°C wurde die Lösung entfernt, und die Laternen mit NMP (5 x, 5 ml, 3 min) gewaschen. Anschliessend wurde über Nacht (15 h) mit den gleichen Bedingungen eine zweite Kupplungsreaktion durchgeführt. Danach wurden die nicht abreagierten sekundären Amine mit Essigsäureanhydrid (2 ml) in DCM (4 ml) 30 min acetyliert, und anschliessend die Laternen mit DMF und DCM (je 3 x, 3 mL)

gewaschen. Die Bestimmung der Beladung erfolgte nach **BBV1** und ergab einen Wert von 2.5 μmol (10%).

15.2.2 Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH auf an die Festphase immobilisierten Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu Vorläufer

Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu Laternen Typ IV **105** wurden nach **AAV2** mit Piperidin/DMF entschützt. Anschliessend wurden die Laternen mit 0.2 M Lösungen an Fmoc-MeLeu-OH, aktiviert durch verschiedene Kupplungsreagenzien und Zusätze (**107-118**), DIEA zur Reaktion gebracht.

Es wurden dabei verschiedene Kupplungszeiten, aber auch Mehrfachkupplungen getestet. Nach dem Abschluss der Kupplungen wurden die Laternen gewaschen (DMF und DCM), nicht abreagierte Amine acetyliert (Essigsäureanhydrid/DCM) und abschliessend wieder gewaschen (DMF und DCM). Die Kupplungsausbeuten wurden durch Bestimmung der Beladungswerte nach **BBV1** quantifiziert. Die nachfolgende Tabelle zeigt die gefundenen Werte.

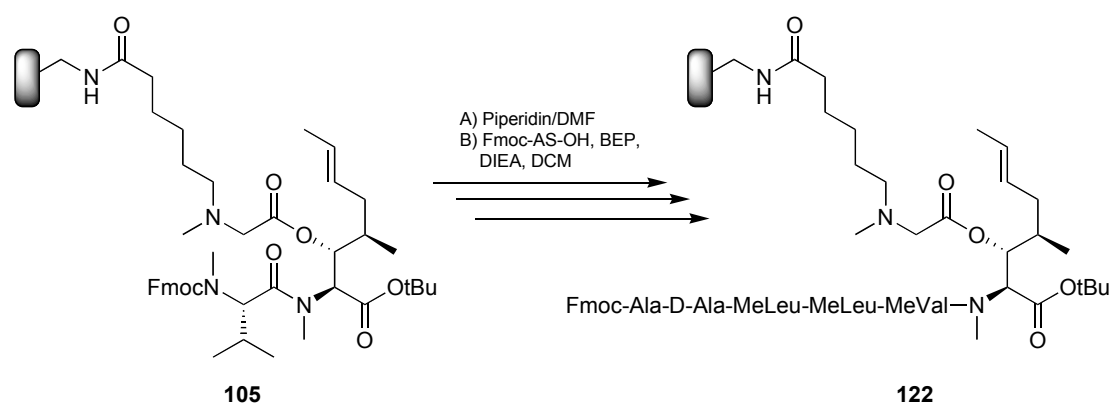


Kupplungsreagens	LM	Ausbeute		
		0.2 M Lösung (1 mL/Laterne ~ 15 eq.)		
		5 h	20 h	5 h / 18 h
DIC	DCM / DMF	71	70	74
DIC / HOAt	DCM / DMF	44	54	54
DIC / HOBt	DCM / DMF	16	nb	nb
DIC / HOObt	THF	24	nb	nb
BOP	DMF	34	nb	nb
TBTU	DMF	36	nb	nb
HATU	DMF	64	62	67
PyBroP	DMF	61	61	65
BEP	DCM	59	69	73
FEP	DCM	10	nb	nb
TFFH	DCM	22	nb	nb
DMTMM	NMP	47	62	73

Tabelle 22 Ausbeuten der Kupplung von Fmoc-MeLeu-OH an H-MeVal-MeBmt(®)-OtBu unter Verwendung verschiedener Kupplungsreagenzien; nb nicht bestimmt

15.3 Synthese von Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Hexapeptid)

15.3.1 Synthese unter Verwendung von BEP als Kupplungsreagens



4 Fmoc-MeVal-MeBmt(®)OtBu Laternen Typ IV **105** (je 27.8 μmol) wurden nach dem unten dargestellten Synthesesyklus bis zum festphasengebundenen Hexapeptid **122** aufgebaut.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde jeweils nach **AAV2** entfernt. Anschliessend wurde mit einer 0.2 M Kupplungslösung (1 ml pro Laterne), bestehend aus der jeweiligen Aminosäure (Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-D-Ala-OH), dem Kupplungsreagens BEP und DIEA (0.4 M), gekuppelt. Die Kupplung erfolgte jeweils in Doppelbeladungsreaktionen (5 h / 18 h) zwischen denen die Laternen mit DCM (5 x, 5 mL, 3 min) gewaschen wurden. Nach der Kupplung der Aminosäuren erfolgte ein Acetylierungsschritt mit Essigsäureanhydrid und DCM, um die verbliebenen nicht abreagierten Amine zu blockieren. Nach jeder Kupplung der verschiedenen Aminosäuren wurde die Beladung nach **BBV1** bestimmt, eine Laterne zur Abspaltung und Produktkontrolle entfernt, und die restlichen Laternen nach dem oben beschriebenen Zyklus mit der nächsten Aminosäure weitergekuppelt.

Auf der letzten Stufe wurde auf eine Beladungsbestimmung verzichtet, um das Hexapeptid **122** analog den kleineren Peptiden als Fmoc-geschütztes Derivat abspalten zu können.

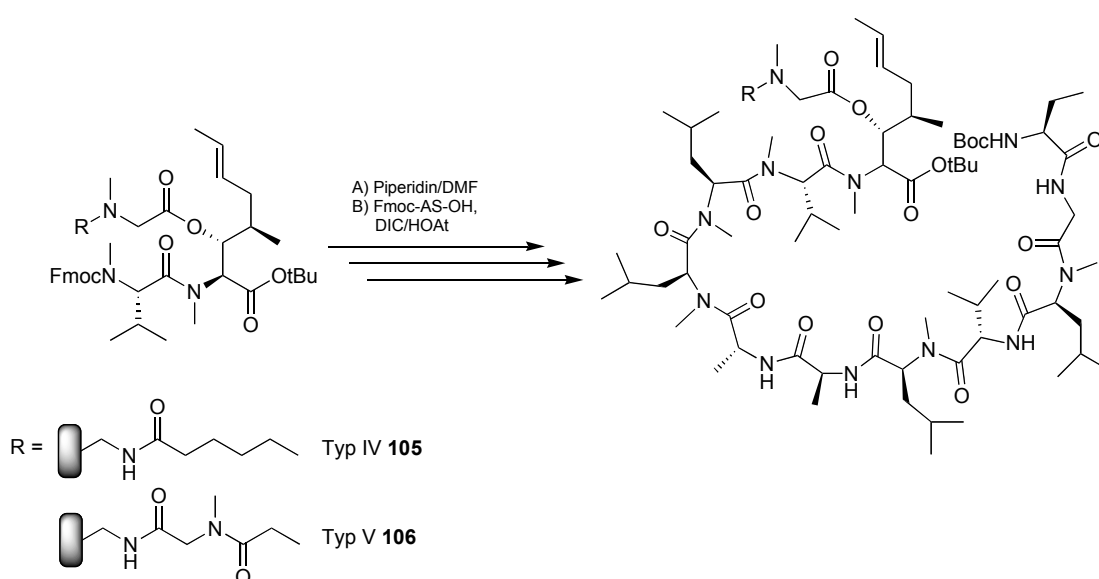
und Produktkontrolle entfernt, und die restlichen Laternen nach dem oben beschriebenen Zyklus mit der nächsten Aminosäure weitergekuppelt.

Auf der letzten Stufe wurde auf eine Beladungsbestimmung verzichtet, um das Hexapeptid **122** analog den kleineren Peptiden als Fmoc-geschütztes Derivat abspalten zu können.

Peptidsequenz	Kupplungsausbeuten	
	Laternen Typ IV 105	Laternen Typ V 106
Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 119	65%	61%
Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 120	78%	68%
Fmoc-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 121	81%	64%
Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 122	87%	96%

Tabelle 24 Kupplungsausbeuten bei der Synthese des Hexapeptids **122** mit DIC/HOAt unter Verwendung von Laternen Typ IV und V

15.4 Synthese von Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(®)-OtBu (Undecapeptid)



Die Synthese des Undecapeptids erfolgte durch Verwendung der für die Synthese des Hexapeptids ausgearbeiteten Synthesesyklus. Je 5 Laternen des Typs IV **105** und des Typs V **106**, die bereits mit dem Hexapeptid beladenen waren, wurden weiter zum Undecapeptid aufgebaut.

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde jeweils nach **AAV2** entfernt. Anschliessend wurde mit einer 0.4 M Kupplungslösung (1 ml pro Laterne), bestehend aus der jeweiligen Aminosäure (Fmoc-MeLeu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Sar-OH, Boc-Abu-OH), dem Kupplungsreagens DIC und HOAt gekuppelt. Die Kupplung erfolgte jeweils in Doppelbeladungsreaktionen (5 h / 18 h) zwischen denen die Laternen mit DCM (5 x, 5 mL, 3 min) gewaschen wurden. Nach der Kupplung der Aminosäuren erfolgte ein Acetylierungsschritt mit Essigsäureanhydrid und DCM, um die verbliebenen nicht abreagierten Amine zu blockieren. Nach jeder Kupplung der verschiedenen Aminosäuren wurde die Beladung nach **BBV1** bestimmt, eine Laterne zur Abspaltung und Produktkontrolle entfernt, und die restlichen Laternen nach dem oben beschriebenen Zyklus mit der nächsten Aminosäure weitergekuppelt.

Auf der letzten Stufe wurde keine Beladungsbestimmung durchgeführt, da diese Laternen später zur Abspaltung beziehungsweise Cyclisierung verwendet wurden.

AS	Peptidsequenz	Beladung (Kupplungsausbeuten)	
		Laternen Typ IV 105	Laternen Typ V 106
2	Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu 101	30.7 μmol	34.0 μmol
3	Fmoc-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 120	20.0 μmol (65%)	20.8 μmol (61%)
4	Fmoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 121	15.5 μmol (78%)	14.0 μmol (68%)
5	Fmoc-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 122	12.5 μmol (81%)	9.00 μmol (64%)
6	Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 123	10.9 μmol (87%)	8.62 μmol (96%)
7	Fmoc-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 135	10.6 μmol (97%)	7.84 μmol (91%)
8	Fmoc-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 136	9.28 μmol (88%)	7.05 μmol (90%)
9	Fmoc-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 137	9.28 μmol (100%)	7.05 μmol (100%)
10	Fmoc-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 138	8.61 μmol (93%)	7.05 μmol (100%)
11	Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu 133	nicht bestimmt	nicht bestimmt
	Gesamtausbeute	28%	21%

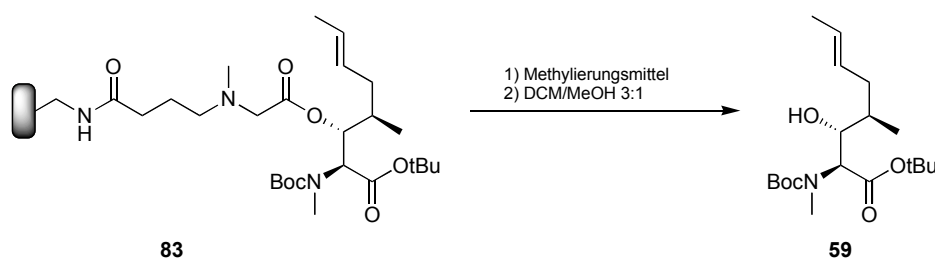
Tabelle 25

*Kupplungsausbeuten bei der Synthese des Undecapeptids **133** mit DIC/HOAt unter Verwendung von Laternen Typ IV und V*

16.1.2 Untersuchung der Aktivierungsbedingungen

Aktivierung: Boc-MeBmt(®)-OtBu Laternen Typ III **83** (Beladung 33.5 μmol) wurden mit verschiedenen Methylierungsmitteln (MeI, Dimethylsulfat, p-Toluolsulfonsäuremethylester, Methyltriflat) während 1 h bei RT aktiviert. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (5 x, 3 mL) gewaschen.

Freisetzung: Die Laternen wurden auf verschiedene Gefässe aufgeteilt und jeweils mit 6 mL Spalllösung DCM/MeOH 3:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (Ac-Val-OtBu) wurde mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung durchgeführt. Zur Überprüfung wurde ebenfalls eine Laterne gespalten, welche vorher nicht aktiviert wurde.



Methylierungsmittel	Bedingungen	Reaktionszeit	Ausbeute
-	-	24 h	0%
Methyliodid	MeI (1 mL/~475 eq.)/1h	24 h	89%
Dimethylsulfat	10 eq./DCM 1 mL/1h	24 h	92%
p-Toluolsulfonsäuremethylester	10 eq./DCM 1 mL/1h	24 h	7%
Methyltriflat	10 eq./DCM 1 mL/1h	24 h	0%

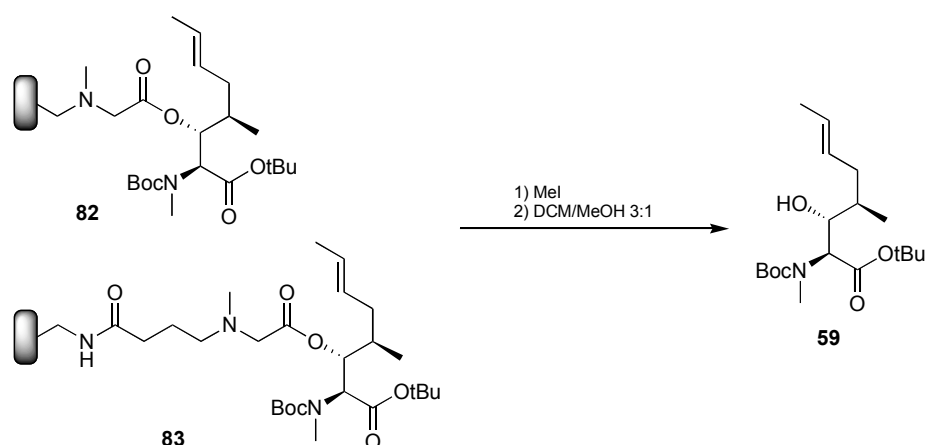
Tabelle 27 Einfluss des Methylierungsmittels auf die Abspaltung

16.1.3 Untersuchung zum Einfluss des Spacers auf die Abspaltung

Aktivierung: Boc-MeBmt(®)-OtBu Laternen Typ I **82** (Beladung 27.1 μmol) und Typ III **83** (Beladung 33.5 μmol) wurden mit MeI (1 mL pro Laterne, ~ 475 eq.) während

1 h bei RT aktiviert. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (5 x, 3 mL) gewaschen.

Freisetzung: Die Laternen wurden auf verschiedene Gefässe aufgeteilt und jeweils mit 6 mL Spalllösung DCM/MeOH 3:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (Ac-Val-OtBu) wurde mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung durchgeführt.



Ausgangsverbindung	Reaktionszeit	Ausbeute
82	48 h	79%
83	48 h	83%

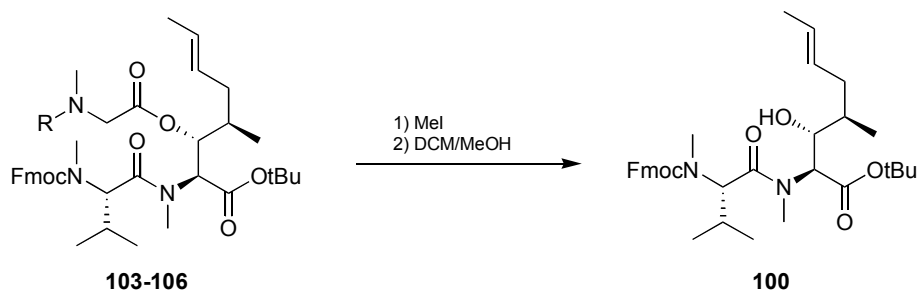
Tabelle 28 Einfluss des Spacers auf die Abspaltung

16.2 Abspaltung von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu

Aktivierung: Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu Laternen Typ II **103** (Beladung 28.6 μmol), Typ III **104** (Beladung 29.2 μmol), Typ IV **105** (Beladung 30.7 μmol) und Typ V **106** (Beladung 34.0 μmol) wurden mit MeI (1 mL pro Laterne) während 1 h bei RT aktiviert. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (5 x, 3 mL) gewaschen.

Freisetzung: Die Laternen wurden auf verschiedene Gefässe aufgeteilt und jeweils mit 6 mL Spalllösung DCM/MeOH 3:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von

internem Standard (Fmoc-MeVal-OtBu) wurde mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung durchgeführt.



Laternentyp	R	Reaktionszeit	Ausbeute
Typ II 103		24 h	69%
Typ III 104		24 h	93%
Typ IV 105		24 h	96%
Typ V 106		24 h	90%

Tabelle 29 Ergebnisse der Abspaltungen von Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu (**100**)

16.3 Abspaltung von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu

Kontrollexperiment zur Überprüfung der Spaltausbeuten bei der Spaltung von verschiedenen Laternen Typen (II-V).

Acetylierung: Fmoc-MeVal-MeBmt(®)-OtBu Laternen Typ II **103** (Beladung 28.6 μmol), Typ III **104** (Beladung 29.2 μmol), Typ IV **105** (Beladung 30.7 μmol) und Typ V **106** (Beladung 34.0 μmol) wurden nach **AAV2** am Aminoende entschützt und anschliessend mit einem Gemisch aus Essigsäureanhydrid (2 mL pro Laterne) in DCM (2 mL pro Laterne) 30 min acetyliert. Danach wurden die Laternen mit DCM (5 x, 5 mL, 3 min) gewaschen und direkt zur Aktivierung/Spaltung eingesetzt.

Aktivierung: Die acetylierten Laternen des Typs II-V wurden mit MeI (1 mL pro Laterne) während 2 h bei RT aktiviert. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (5 x, 3 mL) gewaschen.

Freisetzung: Die Laternen wurden auf verschiedene Gefässe aufgeteilt und jeweils mit 6 mL Spalllösung DCM/MeOH 3:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (Ac-Val-OtBu) wurde mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung durchgeführt.

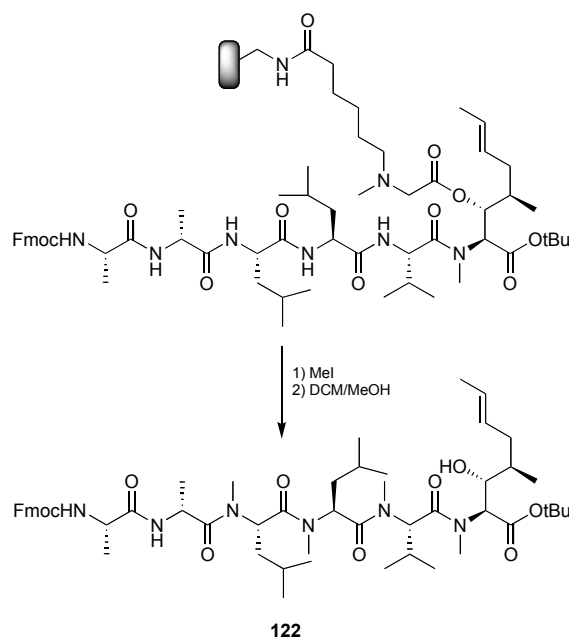


Laternentyp	R	Reaktionszeit	Ausbeute
Typ II 103		24 h	72%
Typ III 104		24 h	99%
Typ IV 105		24 h	97%
Typ V 106		24 h	74%

Tabelle 30 Ergebnisse der Abspaltungen von Ac-MeVal-MeBmt-OtBu (**95**)

16.4 Abspaltung von Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (Hexapeptid)

Abspaltung der Peptide ausgehend von Kapitel 7.3.1 „Synthese unter Verwendung von BEP als Kupplungsreagens“.

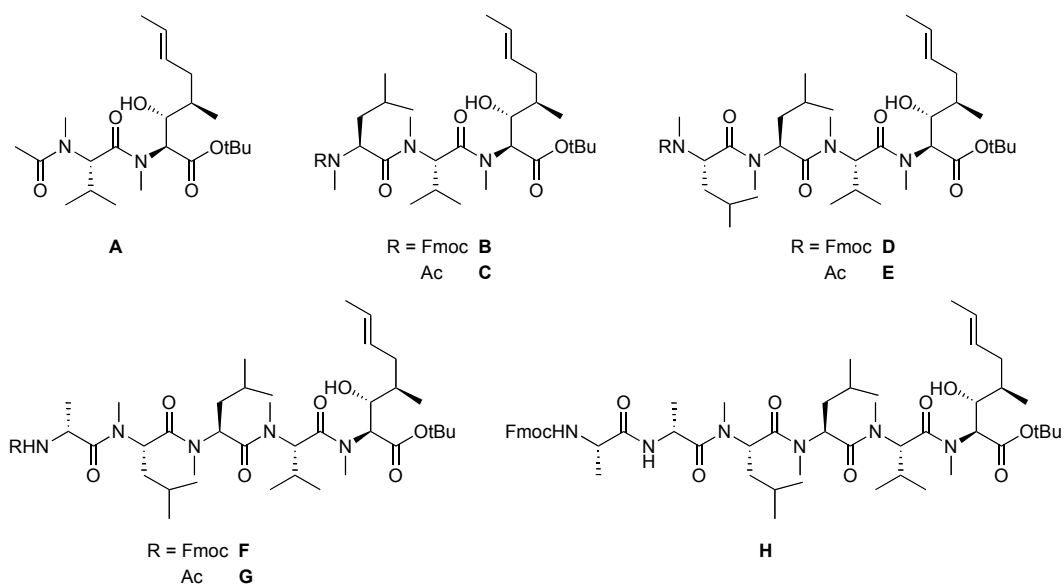


Die durch stufenweisen Aufbau synthetisierten und an die Festphase gebundenen Peptide **119** – **122** wurden während 2 h bei RT mit MeI (1 ml pro Laterne) versetzt. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (3 x, 1 ml, 3 min) gewaschen. Danach erfolgte während 3 h ein Waschgang mit einem Gemisch aus THF (0.5 ml) und Wasser (0.5 ml). Nach der Reinigung der Laternen mit THF (3 x, 1 ml, 3 min) und DCM (3 x, 1 ml, 3 min) wurden die Peptide in einem Gemisch aus DCM (3 ml) und MeOH (1 ml) abgespalten. Die erhaltenen Produkte wurden mit Hilfe von ESI-MS auf das Vorhandensein der gewünschten Verbindungen untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Das Hexapeptid Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (**122**) wurde durch einen R_f -Wert (DC) und t_R -Wert (HPLC) charakterisiert. Die Ausbeute der abgespaltenen Rohprodukte bezieht sich auf die Summe der Massen aller möglichen Spaltprodukte. Das heisst die Summe der jeweiligen Endprodukte (Fmoc-Derivate) und der nicht abreagierten Zwischenprodukte (Ac-Derivate).

Stufe	Produkte Theorie	Masse ESI-MS (m/z)	Ausbeute
Tripeptid 119	A 3.6 mg	435.4 [M+Na] ⁺	14.1 mg (82%)
	B 13.7 mg	742.7 [M+Na] ⁺	
Tetrapeptid 120	A 3.6 mg	435.4 [M+Na] ⁺	10.7 mg (65%)
	C 5.7 mg	nicht gefunden	
	D 7.2 mg	869.5 [M+Na] ⁺	
Pentapeptid 121	A 3.6 mg	435.4 [M+Na] ⁺	8.5 mg (49%)
	C 5.7 mg	562.5 [M+Na] ⁺	
	E 0.4 mg	689.6 [M+Na] ⁺	
	F 7.8 mg	940.7 [M+Na] ⁺	
Hexapeptid 122	A 3.6 mg	435.4 [M+Na] ⁺	9.3 mg (51%)
	C 5.7 mg	562.5 [M+Na] ⁺	
	E 0.4 mg	689.6 [M+Na] ⁺	
	G nb	760.7 [M+Na] ⁺	
	H 8.4 mg	1011.7 [M+Na] ⁺	

Tabelle 31 Ausbeuten der Abspaltungen der Tri-, Tetra, Penta- und Hexapeptide **119-122**



Schema 38 Produkte und Nebenprodukte der Festphasensynthese von Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (**122**, **H**)

Fmoc-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (122)

C₅₅H₈₄N₆O₁₀ (989.29)

R_f (Hexan / Aceton 1:1) = 0.54.

MS (ESI-MS, m/z):

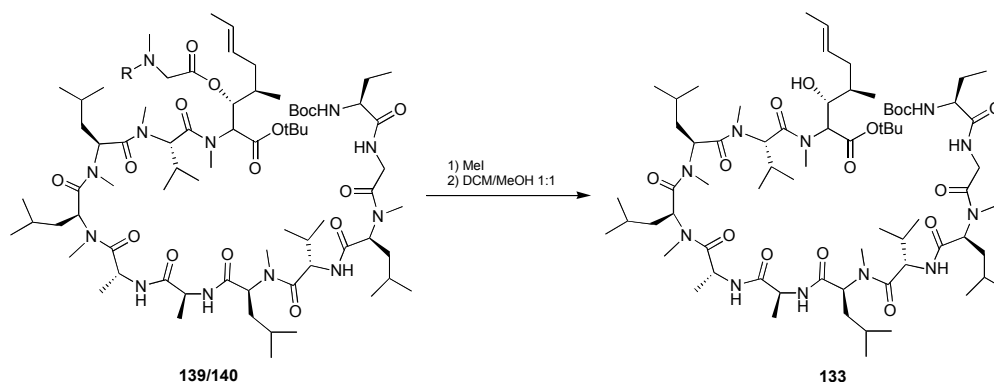
1011.6 (M+Na⁺, 100); 989.5 (M+H⁺, 4).

16.5 Abspaltung von Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (Undecapeptid)**16.5.1 Abspaltung des direkt an die Festphase gekuppelten Undecapeptids**

Freisetzung der Undecapeptide **139** und **140** ausgehend von Kapitel 6.2.4 „Beladung mit linearem Undecapeptid“.

Aktivierung: Eine mit Undecapeptid beladene Laterne Typ II **139** (Beladung 6.8 µmol) und eine Laterne Typ IV **140** (Beladung 14.8 µmol) wurden je mit MeI (2 mL) während 2 h bei RT aktiviert. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (3 x, 3 min), THF/H₂O (1 x, 2h), THF und DCM (je 3 x, 3 min) gewaschen.

Freisetzung: Die Laternen wurden je mit 6 mL Spatlösung DCM/MeOH 1:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (CsC, **123**) konnte mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung durchgeführt werden. Die aus den zwei Ansätzen freigesetzten Peptide entsprachen nach DC, HPLC und ESI-MS dem in Lösung hergestellten Undecapeptid **133** (Referenz). Als Grundlage zur Berechnung der Ausbeuten dienten die vorher bestimmten Beladungswerte (6.8 µmol **139**, 14.8 µmol **140**).



Laternentyp	R	Reaktionszeit	Ausbeute
Typ II 139		24 h	7.4 mg (80%)
Typ IV 140		24 h	15.2 mg (75%)

Tabelle 32 Freisetzung von Undecapeptid **133** aus **139** und **140**

16.5.2 Abspaltung des an der Festphase aufgebauten

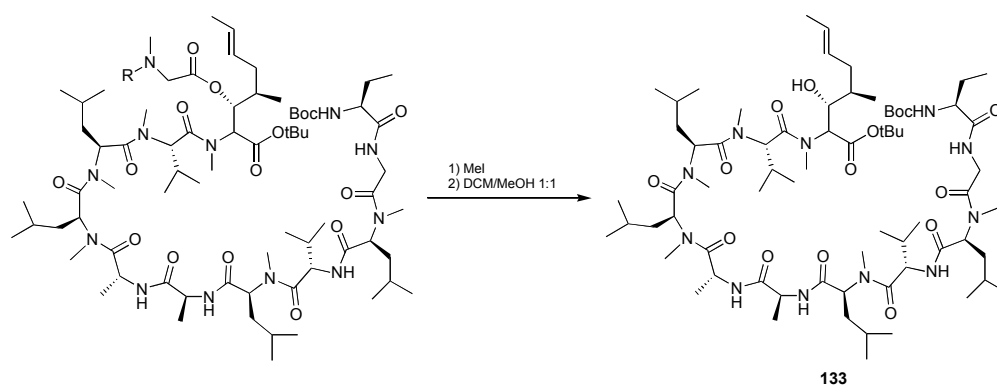
Undecapeptids

Abspaltung der an der Festphase aufgebauten Undecapeptide ausgehend von *Kapitel 7.4 „Synthese von Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (Undecapeptid)“*.

Aktivierung: Die Laternen (Typ IV und Typ V, beladen mit dem an der Festphase aufgebauten Undecapeptid **133**) wurden mit MeI (je 2 mL) während 5 h bei RT aktiviert. Anschliessend wurden die Laternen mit DCM (3 x, 3 min), THF/H₂O (1 x, 2h), THF und DCM (je 3 x, 3 min) gewaschen.

Freisetzung: Die Laternen wurden je mit 6 mL Spaltlösung DCM/MeOH 1:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (CsC, **123**) konnte mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung durchgeführt werden. Die aus den zwei Ansätzen freigesetzten Peptide entsprachen

nach DC, HPLC und ESI-MS dem in Lösung hergestellten Undecapeptid **133** (Referenz). Als Grundlage zur Berechnung der Ausbeuten dienten die Beladungswerte die auf der Stufe Decapeptid **138** bestimmt wurden (8.6 μmol Typ IV, 7.1 μmol Typ V).



Laternentyp	R	Reaktionszeit	Ausbeute
Typ IV		24 h	5.3 mg (45%)
Typ V		24 h	3.8 mg (39%)

Tabelle 33 Freisetzung des an der Festphase aufgebauten Undecapeptids **133**

17 Cyclisierung und Abspaltung der Undecapeptide

17.1 Optimierung der Abspaltungs- und Cyclisierungsbedingungen

Die hier dargestellten Experimente wurden mit Laternen durchgeführt, die direkt mit dem in Lösung hergestellten Undecapeptid **134** beladen wurden. Es gelangten dabei Laternen des Typs II **139** (Beladung 6.8 μmol) und IV **140** (Beladung 14.8 μmol) zum Einsatz.

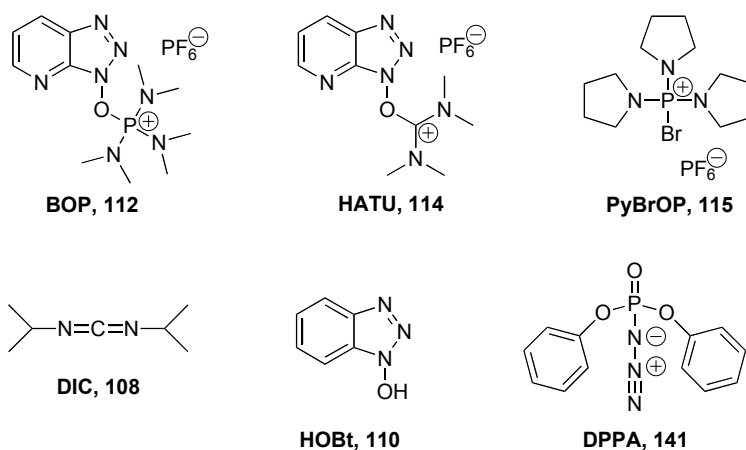
Abspaltung der Schutzgruppen: Die Laternen wurden mit verschiedenen Spallösungen versetzt und über bestimmte Zeitdauern geschüttelt. Anschliessend wurde die Spallösung entfernt und die Laternen mit DCM (5 x, 3 min) gewaschen. Die abgetrennten Spallösungen wurden nicht auf das Vorhandensein von Peptidfragmenten untersucht.

Cyclisierung zu CsA: Die Laternen wurden über bestimmte Zeitdauern mit verschiedenen Kupplungsreagenzien zur Reaktion gebracht. Anschliessend wurde die Kupplungslösung entfernt und die Laternen mit DMF und DCM gewaschen (je 3 x, 3 min).

Aktivierung: Die Laternen wurden nach dem an kürzeren Peptiden ausgearbeiteten Schema mit MeI aktiviert. Die Reaktionszeit wurde auf 5 h angehoben. Anschliessend erfolgte während 3 h ein Waschgang mit einem Gemisch aus THF/H₂O (1:1). Nach dem erneuten Waschen der Laternen mit THF und DCM (je 3 x, 3 min) erfolgte die Freisetzung von der Festphase.

Freisetzung von der Festphase: Die aktivierten Laternen wurden auf verschiedene Gefässe aufgeteilt und jeweils mit der Spallösung DCM/MeOH 1:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (CsC) konnte mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Freisetzung (Gehalt an CsA) durchgeführt werden.

In der nachfolgenden Tabelle sind die durchgeführten Experimente zur Optimierung der Abspaltung der Schutzgruppen und Cyclisierung zusammengefasst (Spaltdauer, Laternentyp, Kupplungsreagens, LM, Kupplungsdauer und Ausbeute nach Abspaltung) dargestellt.



Schema 39 *Verwendete Kupplungsreagenzien für die Cyclisierung an der Festphase*

Exp.	Laterne	Abspaltung der Schutzgruppen		Cyclisierung		Ausbeute
		Lösung	Dauer	Lösung	Dauer	
I	Typ IV	TFA / DCM (1:1)	4 h	DIC / HOBT 0.2 M, DCM	48 h	5%
II	Typ IV	TFA / DCM (1:1)	4 h	BOP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	7%
III	Typ IV	TFA / DCM (1:1)	4 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	10%
IV	Typ IV	TFA / DCM (1:3)	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	10%
VI	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	7%
VII	Typ IV	TFA / DCM (1:10)	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	48 h	6%
VIII	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	8%
IX	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	1 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	11%
X	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	10%
XI	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	1 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	8%
XII	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	10%
XIII	Typ IV	TFA / DCM (1:10), Et ₃ SiH	3 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	15 h	11%
XIV	Typ IV	TFA / DCM (1:2), Et ₃ SiH	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	9 h	7%
XV	Typ IV	TsOH 0.2 M, DCM / THF	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	9 h	6%
XVI	Typ II	TsOH 0.2 M, DCM / THF	2 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	9 h	6%
XVII	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	PyBroP / DIEA 0.2 M, DCM	24 h	12%
XVIII	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	BOP / DIEA 0.2 M, DCM	24 h	8%
XIX	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	HATU / DIEA 0.2 M, DMF	24 h	1%
XX	Typ II	TFA / DCM (2:1)	0.5 h	DPPA / DIEA 0.2 M, DMF	24 h	2%

Tabelle 34 Experimente zur Optimierung der Abspaltungs- und Cyclisierungsbedingungen

17.2 Cyclisierung und Abspaltung an der Festphase

aufgebauter Undecapeptide

Cyclisierung und Abspaltung der an der Festphase aufgebauten Undecapeptide ausgehend von *Kapitel 7.4 „Synthese von Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (Undecapeptid)“*.

Abspaltung der Schutzgruppen: Die Laternen (Typ IV und Typ V, beladen mit dem an der Festphase aufgebauten Undecapeptid **133**) wurden 30 min bei RT mit einem Gemisch aus TFA/DCM (2:1) versetzt. Anschliessend wurde die Spaltlösung entfernt und die Laternen mit DCM (5 x, 3 min) gewaschen.

Cyclisierung zu CsA: Die Laternen wurden mit einer 0.2 M Lösung aus PyBroP und DIEA in DCM versetzt und 24 h bei RT geschüttelt. Anschliessend wurde die Kupplungslösung entfernt und die Laternen mit DMF und DCM gewaschen (je 3 x, 3 min).

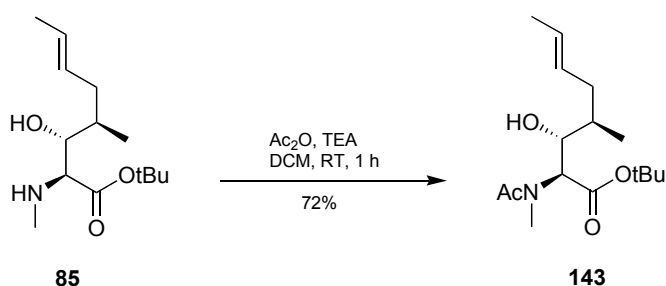
Aktivierung: Die Laternen wurden nach dem an kürzeren Peptiden ausgearbeiteten Schema mit MeI aktiviert. Die Reaktionszeit wurde auf 5 h angehoben. Anschliessend erfolgte während 3 h ein Waschgang mit einem Gemisch aus THF/H₂O (1:1). Nach Reinigung der Laternen mit THF und DCM (je 3 x, 3 min) erfolgte die Freisetzung von der Festphase.

Freisetzung von der Festphase: Die aktivierten Laternen wurden auf verschiedene Gefässe aufgeteilt und jeweils mit Spaltlösung DCM/MeOH 1:1 versetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von internem Standard (CsC) konnte mit Hilfe von HPLC-Chromatogrammen und Flächenfaktoren eine Quantifizierung der Abspaltung (Gehalt an CsA) durchgeführt werden.

18 Synthese der Referenzverbindungen

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Synthesen von Boc-MeBmt-OtBu (**59**), Fmoc-MeBmt-OtBu (**86**), Fmoc-MeVal-MeBmt-OtBu und Boc-Abu-Sar-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-OtBu (**133**) wurden die folgenden Aminosäurenderivate und Peptide als Referenzverbindungen für die Identifikation der Substanzen der Abspaltungs- und Cyclisierungsversuche sowie als Standards für die Quantifizierung der HPLC-Chromatogramme hergestellt und analysiert.

N-(Acetyl)-(2S, 3R, 4R, 6E)-3-Hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-tert-butylester (143, Ac-MeBmt-OtBu)



Die entschützte Aminosäure **85** (105 mg, 0.36 mmol, HCl-Salz) wurde in DCM (5 ml) gelöst und bei RT mit TEA (200 μ l, 1.44 mmol, 4 eq.) und Essigsäureanhydrid (200 μ l, 2.12 mmol, 5.9 eq.) versetzt. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 3:2) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 78 mg (0.26 mmol, 72%) der acetylierten Aminosäure **143** als farblosen Schaum.

$\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ (299.41)

R_f (Hexan / Essigester 2:3) = 0.26.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm):

5.53-5.38 (*m*, 2H, H-(C6), H-(C7)); 4.90 (*d*, $J = 4.0$, 1H, H-(C2)); 3.93-3.89 (*m*, 1H, H-(C3)); 3.48 (*bs*, 1H, HO-(C3)); 3.11 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 2.42-2.37 (*m*, 1H, H-(C5));

2.16 (*s*, 3H, Acetyl); 1.95-1.88 (*m*, 1H, H-(C5)); 1.67 (*d*, $J = 5.0$, 3H, H-(C8)); 1.61-1.50 (*m*, 1H, H-(C4)); 1.48 (*s*, 9H, *t*Bu); 0.85 (*d*, $J = 6.6$, 3H, CH₃-(C4)).

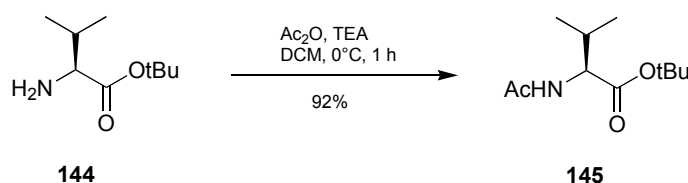
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

172.8 (C^{Ac}); 169.2 (C1); 129.2 (C6); 127.0 (C7); 81.2 (*t*Bu); 75.6 (C3); 62.3 (C2); 36.6 (C4); 36.2 (CH₃-N); 35.8 (C5); 28.1 (*t*Bu); 22.2 (C^{Ac}); 17.9 (C8); 15.9 (CH₃-(C4)).

MS (ESI-MS, *m/z*):

322.1 ([M+Na]⁺, 100); 266.2 ([M-*t*Bu]⁺, 7).

***N*-(Acetyl)-valin-tert-butylester (145, Ac-Val-OtBu)**



H-Val-OtBu (**144**, 800 mg, 3.81 mmol, HCl-Salz) wurde in DCM (10 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von TEA (2.00 ml, 14.4 mmol, 3.8 eq.) und Essigsäureanhydrid (1.00 ml, 10.6 mmol, 2.8 eq.) wurde das Eisbad entfernt und 20 min bei RT gerührt.

Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch mit 100 mL Essigester in einen Scheidetrichter überführt und mit Zitronensäure 10%, gesättigter Natriumbicarbonatlösung und Sole extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat, Einengen am Rotationsverdampfer und mehrmaligem Koevaporieren mit DCM erhielt man 755 mg (3.51 mmol, 92%) der acetylierten Aminosäure **145** als farblose Kristalle.

C₁₁H₂₁NO₃ (215.29)

R_f (Hexan / Essigester 5:1) = 0.26.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

5.98 (*d*, $J = 7.3$, 1H, HN); 4.47 (*dd*, $J = 4.5, 8.8$, 1H, H-(C2)); 2.15 (*m*, 1H, H-(C3)); 2.03 (*s*, 3H, H-(C^{Ac})); 1.47 (*t*Bu); 0.94 (*d*, $J = 6.8$, 3H, H-(C4)); 0.91 (*d*, $J = 7.1$, 3H, H-(C4)).

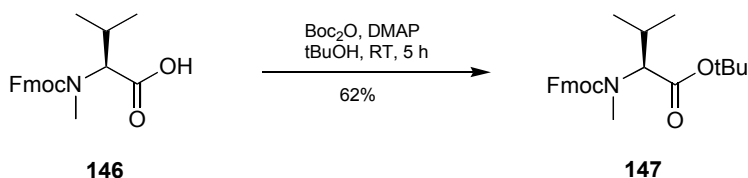
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

171.8 (C1); 170.2 (C^{Ac}); 82.4 (*t*Bu); 57.7 (C2); 31.9 (C3); 28.4 (*t*Bu); 23.7 (C^{Ac}); 19.2 (C4); 18.1 (C4).

MS (ESI-MS, *m/z*):

238.1 ([M+Na]⁺, 100); 182.1 ([M-*t*Bu+H]⁺, 41).

***N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*N*-(methyl)-valin-*tert*-butylester**
(147, Fmoc-MeVal-OtBu)



Fmoc-MeVal-OH (**146**, 250 mg, 0.71 mmol) wurden in 10 mL *tert*-Butanol suspendiert. Anschliessend wurden 463 mg (2.13 mmol, 3 eq.) Boc₂O und 26 mg (0.21 mmol, 0.3 eq.) DMAP zugegeben und bei RT gerührt. Nach 5 h wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingengt und an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Essigester 6:1) chromatographisch gereinigt. Es wurden 180 mg (0.44 mmol, 62%) MeVal-Derivat **147** als farbloser Schaum erhalten.

C₂₅H₃₁NO₄ (409.52)

R_f (Hexan / Essigester 5:1) = 0.31.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1.1:1

7.77 (*d*, *J* = 7.5, 4H, H-(C7^{Fmoc})); 7.66-7.60 (*m*, 4H, H-(C4^{Fmoc})); 7.40 (*bt*, *J* = 7.5, 4H, H-(C6^{Fmoc})); 7.34-7.30 (*m*, 4H, H-(C5^{Fmoc})); 4.57 (*dd*, *J* = 6.3, 10.5, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.45 (*m*, 2H, H-(C1^{Fmoc}), A); 4.39 (*d*, *J* = 10.4, 1H, H-(C2), A); 4.35 (*dd*, *J* = 6.3, 10.5, 1H, H-(C1^{Fmoc}), B); 4.28 (*t*, *J* = 6.5, 1H, H-(C2^{Fmoc}), A); 4.26 (*t*, *J* = 6.6, 1H, H-(C2^{Fmoc}), B); 4.08 (*d*, *J* = 10.7, 1H, H-(C2), B); 2.90 (*s*, 3H, CH₃-N, A); 2.89 (*s*, 3H, CH₃-N, B); 2.20-2.08 (*m*, 2H, H-(C3)); 1.46 (*s*, 9H, *t*Bu, A); 1.45 (*s*, 9H, *t*Bu, B); 1.01 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C4), A); 0.93 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C4), B); 0.87 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4), A); 0.76 (*d*, *J* = 6.7, 3H, H-(C4), B).

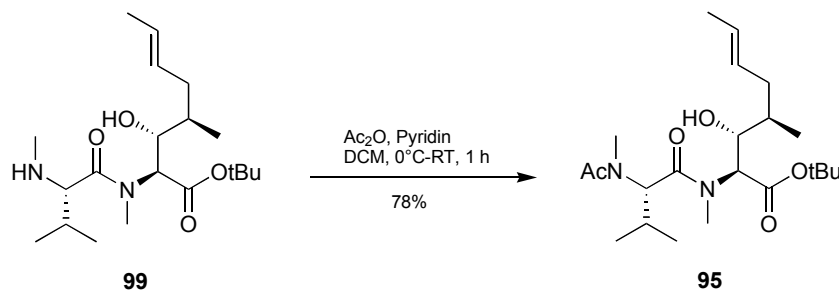
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm): Rotamere A/B ~1.1:1

170.5 (C1, A); 170.0 (C1, B); 157.0 (Fmoc, A); 156.4 (Fmoc, B); 144.2, 144.1, 144.0, 143.9 (4C, C3^{Fmoc}); 141.4 (4C, C8^{Fmoc}); 127.7 (4C, C6^{Fmoc}); 127.0 (4C, C5^{Fmoc}); 125.0 (4C, C4^{Fmoc}); 120.0 (4C, C7^{Fmoc}); 81.5 (*t*Bu, B); 81.4 (*t*Bu, A); 67.6 (2C, C1^{Fmoc}); 65.0 (C2, B); 64.6 (C2, A); 47.3 (2C, C2^{Fmoc}); 30.1 (CH₃-N, A); 30.0 (CH₃-N, B); 28.1 (*t*Bu); 27.7 (C3, A); 27.4 (C3, B); 19.7 (2C, C4); 19.1 (C4, A); 18.9 (C4, B).

MS (ESI-MS, m/z):

432.3 ([M+Na]⁺, 100); 376.3 ([M-*t*Bu]⁺, 25).

***N*-(Acetyl)-*N*-(methyl)-valyl-(2*S*, 3*R*, 4*R*, 6*E*)-3-hydroxy-4-methyl-2-methylamino-6-octensäure-*tert*-butylester (95, Ac-MeVal-MeBmt-OtBu)**



H-MeVal-MeBmt-OtBu (**99**, 115 mg, 0.31 mmol) wurde in DCM (5 ml) gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Nach der Zugabe von Pyridin (200 µl, 2.49 mmol, 8.0 eq.) und Essigsäureanhydrid (200 µl, 2.12 mmol, 6.8 eq.) wurde das Eisbad entfernt und

1 h bei RT gerührt. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt an Kieselgel (Uetikon, Hexan / Aceton 5:1) chromatographisch gereinigt. Man erhielt 100 mg (0.24 mmol, 78%) des geschützten Dipeptids **95** als farbloses Öl.

$C_{22}H_{40}N_2O_5$ (412.56)

R_f (Hexan / Aceton 2:1) = 0.43.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): Rotamere A/B ~6:1

5.56-5.48 (*m*, 2H, H-(C6¹), H-(C7¹), B); 5.44 (*m*, 1H, H-(C7¹)); 5.38 (*m*, 1H, H-(C6¹)); 5.21 (*d*, $J = 10.8$, 1H, H-(C2¹¹), A); 5.04 (*d*, $J = 10.5$, 1H, H-(C2¹¹), B); 4.93 (*bs*, 1H, H-(C2¹), A); 4.84 (*d*, $J = 5.2$, 1H, H-(C2¹), B); 3.98 (*m*, 1H, H-(C3¹), B); 3.91 (*ddd*, 1H, H-(C3¹), A); 3.38 (*bs*, 1H, HO-(C3¹), A); 3.16 (*s*, 3H, CH₃-N¹, A); 2.97 (*s*, 3H, CH₃-N¹, B); 2.94 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹, A); 2.82 (*s*, 3H, CH₃-N¹¹, B); 2.39 (*m*, 1H, H-(C3¹¹), B); 2.34 (*m*, 1H, H-(C5¹), A); 2.31 (*m*, 1H, H-(C3¹¹), A); 2.11 (*s*, 3H, Ac, A); 2.04 (*s*, 3H, Ac, B); 1.90 (*dt*, $J = 13.8, 7.8$, 1H, H-(C5¹), A); 1.67 (*m*, 1H, H-(C4¹), B); 1.64 (*d*, $J = 5.9$, 3H, H-(C8¹), A); 1.47 (*m*, 1H, H-(C4¹), A); 1.45 (*s*, 9H, *t*Bu¹); 0.98 (*d*, $J = 6.8$, 3H, CH₃-(C4¹), B); 0.94 (*d*, $J = 5.4$, 3H, H-(C4¹¹), A); 0.89 (*d*, $J = 6.4$, 3H, H-(C4¹¹), B); 0.84 (*d*, $J = 6.8$, 3H, H-(C4¹¹), A); 0.79 (*d*, $J = 6.7$, 3H, CH₃-(C4¹), A); 0.77 (*d*, $J = 7.5$, 3H, H-(C4¹¹), B).

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm): Rotamere A/B ~6:1

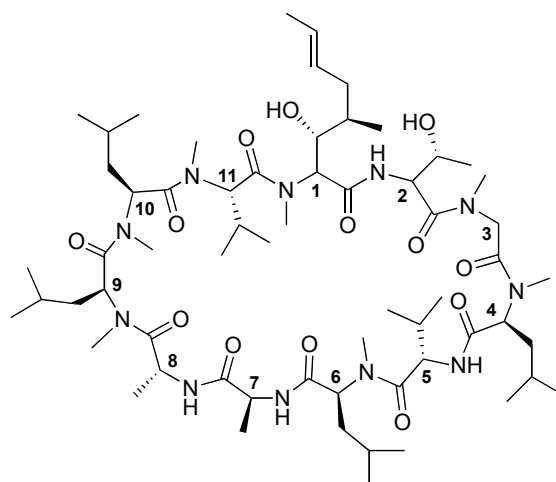
172.0 (C1¹¹, A); 171.1 (2C, Ac, A; C1¹¹, B); 170.2 (Ac, B); 169.2 (C1¹, B); 169.1 (C1¹, A); 129.1 (2C, C6¹); 127.2 (C7¹, B); 127.0 (C7¹, A); 82.3 (*t*Bu¹, A); 82.2 (*t*Bu¹, B); 75.2 (C3¹, A); 75.0 (C3¹, B); 62.3 (C2¹, B); 61.8 (C2¹, A); 57.9 (C2¹¹, B); 57.8 (C2¹¹, A); 36.0 (C4¹, A); 35.6 (C5¹, A); 35.5 (CH₃-N¹, A); 35.1 (C5¹, B); 35.0 (C4¹, B); 32.0 (CH₃-N¹, B); 31.2 (CH₃-N¹¹, A); 30.9 (CH₃-N¹¹, B); 28.1 (*t*Bu¹, B); 28.0 (*t*Bu¹, A); 27.3 (C3¹¹, A); 27.1 (C3¹¹, B); 22.0 (Ac, A); 21.7 (Ac, B); 19.9 (C4¹¹, B); 19.5 (C4¹¹, A); 18.2 (2C, C4¹¹, A; C8¹, B); 18.0 (C8¹, A); 17.9 (C4¹¹, B); 16.5 (CH₃-(C4¹), B); 15.8 (CH₃-(C4¹), A).

MS (ESI-MS, m/z):

435.2 ($[M+Na]^+$, 100); 379.3 ($[M-tBu+Na]^+$, 8).

Cyclosporin C (123, CsC)

Von der Firma Novartis zur Verfügung gestellt. Cyclosporin C wurde neben der Funktion als internem Standard ebenfalls als Edukt für das lineare Undecapeptid **133** verwendet.

**123**

$C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$ (1218.61)

R_f (Hexan / Aceton 1:1) = 0.21.

 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

8.13 (*d*, $J = 9.8$, 1H, HN^2); 7.74 (*d*, $J = 7.0$, 1H, HN^7); 7.24 (*d*, $J = 7.8$, 1H, HN^8); 7.15 (*d*, $J = 9.0$, 1H, HN^5); 5.67 (*dd*, $J = 4.2, 11.2$, 1H, H-(C2⁹)); 5.36-5.28 (*m*, 4H, H-(C2¹), H-(C2⁴), H-(C6¹), H-(C7¹)); 5.12 (*d*, $J = 11.1$, 1H, H-(C2¹¹)); 5.10 (*t*, $J = 7.2$, 1H, H-(C2¹⁰)); 5.05 (*dd*, $J = 5.3, 10.5$, 1H, H-(C2⁶)); 4.93 (*dd*, $J = 4.0, 9.8$, 1H, H-(C2²)); 4.80 (*quint*, $J = 7.1$, 1H, H-(C2⁸)); 4.76 (*t*, $J = 9.2$, 1H, H-(C2⁵)); 4.72 (*d*, $J = 14.2$, 1H, H-(C2³)); 4.43 (*quint*, $J = 7.2$, 1H, H-(C2⁷)); 4.06 (*m*, 1H, H-(C3²)); 3.94 (*q*, $J = 6.7$, 1H, H-(C3¹)); 3.86 (*bs*, 1H, HO-(C3²)); 3.49 (*s*, 3H, CH_3-N^1); 3.39 (*s*, 3H, CH_3-N^3); 3.21 (*bd*, $J = 14.2$, 1H, H-(C2³)); 3.19 (*s*, 3H, CH_3-N^6); 3.13 (*s*, 3H, CH_3-N^9); 3.05 (*s*, 4H, HO-(C3¹), CH_3-N^4); 2.69 (*s*, 3H, CH_3-N^{11}); 2.67 (*s*, 3H, CH_3-N^{10});

2.16 (*m*, 1H, H-(C3¹¹)); 2.15 (*m*, 1H, H-(C3⁵)); 2.13 (*m*, 1H, H-(C3⁹)); 2.07 (*m*, 1H, H-(C3⁶)); 2.06 (*m*, 1H, H-(C3¹⁰)); 1.95 (*ddd*, *J* = 4.3, 10.3, 14.6, 1H, H-(C3⁴)); 1.76 (*m*, 1H, H-(C4⁶)); 1.69 (*m*, 2H, H-(C5¹)); 1.60 (*m*, 1H, H-(C3⁴)); 1.59 (*m*, 3H, H-(C8¹)); 1.46 (*m*, 1H, H-(C4¹⁰)); 1.41 (*m*, 1H, H-(C4⁴)); 1.39 (*d*, *J* = 7.3, 3H, H-(C3⁷)); 1.31 (*m*, 1H, H-(C4⁹)); 1.28 (*m*, 1H, H-(C3⁶)); 1.25 (*m*, 1H, H-(C3¹⁰)); 1.24 (*d*, *J* = 6.9, 3H, H-(C3⁸)); 1.19 (*m*, 1H, H-(C3⁹)); 1.08 (*d*, *J* = 6.3, 3H, CH-(C3²)); 1.01 (*d*, *J* = 6.3, 3H, H-(C5¹⁰)); 1.00 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C5¹⁰)); 0.98 (*d*, *J* = 6.8, 3H, H-(C4⁵)); 0.94 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C5⁹)); 0.93 (*2d*, *J* = 7.0, 6H, H-(C4¹¹), H-(C5⁴)); 0.92 (*d*, *J* = 6.6, 3H, H-(C5⁶)); 0.87 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C5⁴)); 0.85 (*2d*, *J* = 6.5, 6.9, 6H, H-(C4⁵), H-(C5⁹)); 0.83 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C4¹¹)); 0.80 (*d*, *J* = 6.5, 3H, CH₃-(C4¹)); 0.79 (*d*, *J* = 6.5, 3H, H-(C5⁶)).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

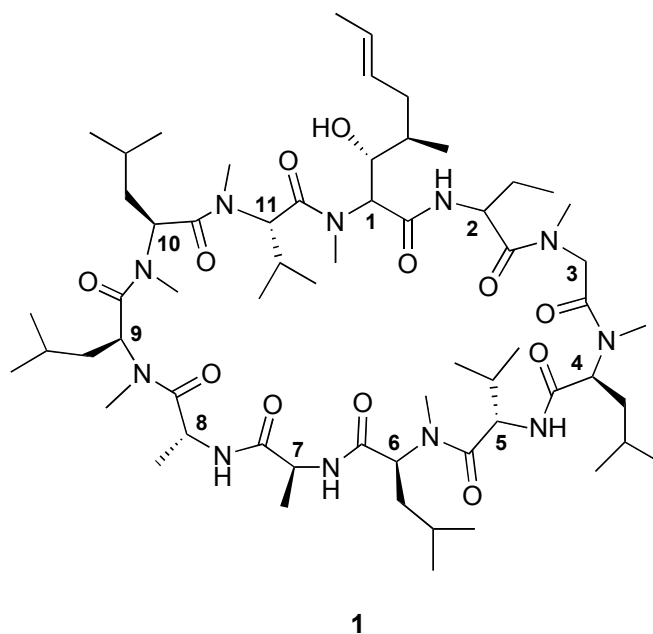
173.9 (C1¹¹); 173.6 (C1⁸); 173.5 (C1²); 173.2 (C1⁵); 171.3 (2C, C1⁶, C1⁷); 170.8, 170.7 (3C, C1¹, C1³, C1⁹); 170.3 (C1¹⁰); 169.9 (C1⁴); 129.4 (C6¹); 126.4 (C7¹); 74.1 (C3¹); 67.2 (C3²); 59.0 (C2¹); 58.0 (C2¹¹); 57.4 (C2¹⁰); 55.2 (C2⁴); 54.8 (C2⁵); 54.7 (C2⁶); 51.3 (C2²); 49.9 (C2³); 48.7 (C2⁷); 48.1 (C2⁹); 45.1 (C2⁸); 40.7 (C3¹⁰); 39.4 (CH₃-N³); 39.1 (C3⁹); 37.3 (C3⁶); 35.9 (C3⁴); 35.2 (C4¹); 34.8 (C5¹); 33.4 (CH₃-N¹); 32.0 (C3⁵); 31.4 (CH₃-N⁶); 31.2 (CH₃-N⁴); 29.9, 29.8 (2C, CH₃-N¹⁰, CH₃-N¹¹); 29.6 (CH₃-N⁹); 29.1 (C3¹¹); 25.0 (C4⁶); 24.8 (C4⁴); 24.7 (C4⁹); 24.5 (C4¹⁰); 23.9, 23.8, 23.7, 23.5, 23.4 (5C, C5⁴, C5⁶, C5⁹, C5¹⁰); 21.8, 21.6, 21.3 (3C, C5⁴, C5⁶, C5⁹); 20.2 (C4¹¹); 19.3 (C4⁵); 18.8 (C4¹¹); 18.7 (CH₃-C3²); 18.5 (C4⁵); 18.0 (C3⁸); 17.9 (C8¹); 16.9 (CH₃-C4¹); 15.9 (C3⁷).

MS (ESI-MS, m/z):

1241.1 ([M+Na]⁺, 100); 1219.0 ([M+H]⁺, 2).

Cyclosporin A (1, CsA)

Von der Firma Novartis zur Verfügung gestellt. Cyclosporin A wurde als Referenzstandard für die Cyclisierungsexperimente benutzt.



$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ (1202.61)

R_f (Hexan / Aceton 1:1) = 0.32.

MS (ESI-MS, m/z):

1225.1 ($[M+Na]^+$, 100); 1203.1 ($[M+H]^+$, 3).

19 Quantifizierungen

19.1 Bestimmung der Ausbeuten anhand von relativen Flächenfaktoren

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ausbeuten der Produkte nach Abspaltungen in Modellversuchen oder von der Festphase (allgemein als **X** bezeichnet) wurden direkt aus den HPLC-Chromatogrammen, mit den entsprechenden Flächenfaktoren F_x , bezogen auf den zugesetzten Standard, bestimmt. Die qualitative Analyse, das heisst die Identifikation der jeweiligen Produkte **X** führt man durch Hinzufügen der unabhängig synthetisierten oder kommerziell erhältlichen Verbindung **X** als Referenzen durch. Nach präziser Einwaage der Verbindung **X** und des Standards wurden die aus dem HPLC-Chromatogramm erhaltenen integrierten Flächen in Prozenten nach der Gleichung (1) mit den Einwaagen verrechnet, wobei man die Flächenfaktoren F_x der Verbindung **X** relativ zum Standard erhielt.

$$F_x = \frac{\text{Verbindung X [Einwaage]} * \text{Standard [Flächen - \%]}}{\text{Standard [Einwaage]} * \text{Verbindung X [Flächen - \%]}} \quad (1)$$

Die verwendeten Flächenfaktoren F_x wurden durch das arithmetische Mittel mehrerer Einwaagen und wiederholter HPLC-Injektionen der Verbindung **X** mit dem entsprechenden Standard bestimmt. Die Bestimmung der Ausbeuten der Produkte nach den Abspaltungen wurde basierend auf der Gleichung (1) nach Umformen anhand des Ausdrucks (2) durchgeführt. Durch die Einwaage des Standards und dem zuvor ermittelten, relativen Flächenfaktor F_x lässt sich die Ausbeute der Verbindung **X** direkt ermitteln.

$$\text{Verbindung X [Ausbeute]} = F_x * \frac{\text{Standard [Einwaage]} * \text{Verbindung X [Flächen - \%]}}{\text{Standard [Flächen - \%]}} \quad (2)$$

Die angegebenen Ausbeuten der Verbindungen **X** wurden durch das arithmetische Mittel mehrerer HPLC-Injektionen der zu untersuchenden Reaktionsmischungen bestimmt und sind in Prozent angegeben.

20 Literaturverzeichnis

1. Fliri, H.; Wenger, R., *Cyclosporine: Synthetic Studies, Structure-Activity Relationships, Biosynthesis and Mode of Action*. Water de Gruyter Berlin/New York: 1990.
2. Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U.; Stahelin, H., Biological Effects of Cyclosporin-a - New Antilymphocytic Agent. *Agents and Actions* **1976**, 6, (4), 468-475.
3. Ruegger, A.; Kuhn, M.; Lichti, H.; Loosli, H. R.; Huguenin, R.; Quiquerez, C.; Wartburg, A. V., Cyclosporin-A, a Peptide Metabolite from *Trichoderma-Polysporum* (Link Ex Pers) Rifai, with a Remarkable Immunosuppressive Activity. *Helvetica Chimica Acta* **1976**, 59, (4), 1075-1092.
4. Borel, J. F.; Feurer, C.; Magnee, C.; Stahelin, H., Effects of New Anti-Lymphocytic Peptide Cyclosporin-A in Animals. *Immunology* **1977**, 32, (6), 1017-1025.
5. Dreyfuss, M.; Harri, E.; Hofmann, H.; Kobel, H.; Pache, W.; Tscherter, H., Cyclosporin-A and C New Metabolites from *Trichoderma-Polysporum* (Link Ex Pers) Rifai. *European Journal of Applied Microbiology* **1976**, 3, (2), 125-133.
6. Bell, A.; Wernli, B.; Franklin, R. M., Roles of Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase and Calcineurin in the Mechanisms of Antimalarial Action of Cyclosporine-A, Fk506, and Rapamycin. *Biochemical Pharmacology* **1994**, 48, (3), 495-503.
7. Bell, A.; Roberts, H. C.; Chappell, L. H., The antiparasite effects of cyclosporin A: Possible drug targets and clinical applications. *General Pharmacology* **1996**, 27, (6), 963-971.
8. Billich, A.; Hammerschmid, F.; Peichl, P.; Wenger, R.; Zenke, G.; Quesniaux, V.; Rosenwirth, B., Mode of Action of Sdz Nim-811, a Nonimmunosuppressive Cyclosporine-A Analog with Activity against Human-Immunodeficiency-Virus (HIV) Type-1 - Interference with HIV Protein-Cyclophilin-A Interactions. *Journal of Virology* **1995**, 69, (4), 2451-2461.
9. *Novartis Geschäftsbericht*; 2007.
10. Traber, R.; Kuhn, M.; Ruegger, A.; Lichti, H.; Loosli, H. R.; Wartburg, A. V., Structure of Cyclosporin-C. *Helvetica Chimica Acta* **1977**, 60, (4), 1247-1255.
11. Traber, R.; Hofmann, H.; Loosli, H. R.; Ponelle, M.; Vonwartburg, A., Novel Cyclosporins from *Tolypocladium-Inflatum* - the Cyclosporins-K-Z. *Helvetica Chimica Acta* **1987**, 70, (1), 13-36.
12. Loosli, H. R.; Kessler, H.; Oschkinat, H.; Weber, H. P.; Petcher, T. J.; Widmer, A., Peptide Conformations .31. The Conformation of Cyclosporin-A in the Crystal and in Solution. *Helvetica Chimica Acta* **1985**, 68, (3), 682-704.
13. Kessler, H.; Kock, M.; Wein, T.; Gehrke, M., Reinvestigation of the Conformation of Cyclosporine-A in Chloroform. *Helvetica Chimica Acta* **1990**, 73, (7), 1818-1832.
14. Weber, C.; Wider, G.; Vonfreyberg, B.; Traber, R.; Braun, W.; Widmer, H.; Wuthrich, K., The NMR Structure of Cyclosporine-A Bound to Cyclophilin in Aqueous-Solution. *Biochemistry* **1991**, 30, (26), 6563-6574.

15. Handschumacher, R. E.; Harding, M. W.; Rice, J.; Drugge, R. J., Cyclophilin - a Specific Cytosolic Binding-Protein for Cyclosporin-A. *Science* **1984**, 226, (4674), 544-547.
16. Fesik, S. W.; Gampe, R. T.; Eaton, H. L.; Gemmecker, G.; Olejniczak, E. T.; Neri, P.; Holzman, T. F.; Egan, D. A.; Edalji, R.; Simmer, R.; Helfrich, R.; Hochlowski, J.; Jackson, M., Nmr-Studies of [U-C-13]Cyclosporin-A Bound to Cyclophilin - Bound Conformation and Portions of Cyclosporine Involved in Binding. *Biochemistry* **1991**, 30, (26), 6574-6583.
17. Spitzfaden, C.; Weber, H. P.; Braun, W.; Kallen, J.; Wider, G.; Widmer, H.; Walkinshaw, M. D.; Wuthrich, K., Cyclosporine-A - Cyclophilin Complex-Formation - a Model Based on X-Ray and NMR Data. *Febs Letters* **1992**, 300, (3), 291-300.
18. Altschuh, D.; Vix, O.; Rees, B.; Thierry, J. C., A Conformation of Cyclosporine-A in Aqueous Environment Revealed by the X-Ray Structure of a Cyclosporine-Fab Complex. *Science* **1992**, 256, (5053), 92-94.
19. Kobel, H.; Traber, R., Directed Biosynthesis of Cyclosporins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **1982**, 14, (4), 237-240.
20. Zocher, R.; Madry, N.; Peeters, H.; Kleinkauf, H., Biosynthesis of Cyclosporin-A. *Phytochemistry* **1984**, 23, (3), 549-551.
21. Kobel, H.; Loosli, H. R.; Voges, R., Contribution to Knowledge of the Biosynthesis of Cyclosporin-A. *Experientia* **1983**, 39, (8), 873-876.
22. Lawen, A.; Zocher, R., Cyclosporine Synthetase - the Most Complex Peptide Synthesizing Multienzyme Polypeptide So Far Described. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, 265, (19), 11355-11360.
23. Schmidt, B.; Riesner, D.; Lawen, A.; Kleinkauf, H., Cyclosporine Synthetase Is a 1.4 Mda Multienzyme Polypeptide - Reevaluation of the Molecular Mass of Various Peptide Synthetases. *Febs Letters* **1992**, 307, (3), 355-360.
24. Dittmann, J.; Wenger, R. M.; Kleinkauf, H.; Lawen, A., Mechanism of Cyclosporine-a Biosynthesis - Evidence for Synthesis Via a Single Linear Undecapeptide Precursor. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, (4), 2841-2846.
25. Quesniaux, V., The Use of Monoclonal-Antibodies to Probe the Surface of Cyclosporines. *Transplantation Proceedings* **1986**, 18, (6), 111-114.
26. Quesniaux, V.; Tees, R.; Schreier, M. H.; Wenger, R. M.; Donatsch, P.; Vanregenmortel, M. H. V., Monoclonal-Antibodies to Ciclosporin. *Progress in Allergy* **1986**, 38, 108-&.
27. Wenger, R. M., Synthesis of Cyclosporine .3. Total Syntheses of Cyclosporin-A and Cyclosporin-H, 2 Fungal Metabolites Isolated from the Species Tolypocladium-Inflatum Gams. *Helvetica Chimica Acta* **1984**, 67, (2), 502-525.
28. Wenger, R. M., Synthesis of Cyclosporine .1. Synthesis of Enantiomerically Pure (2S,3R,4R,6E)-3-Hydroxy-4-Methyl-2-Methylamino-6-Octenoic Acid Starting from Tartaric Acid. *Helvetica Chimica Acta* **1983**, 66, (7), 2308-2321.
29. Evans, D. A.; Weber, A. E., Asymmetric Glycine Enolate Aldol Reactions - Synthesis of Cyclosporines Unusual Amino-Acid, Mebmt. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, 108, (21), 6757-6761.
30. Seebach, D.; Juaristi, E.; Miller, D. D.; Schickli, C.; Weber, T., Addition of Chiral Glycine, Methionine, and Vinylglycine Enolate Derivatives to Aldehydes

- and Ketones in the Preparation of Enantiomerically Pure Alpha-Amino-Beta-Hydroxy Acids. *Helvetica Chimica Acta* **1987**, 70, (1), 237-261.
31. Tung, R. D.; Rich, D. H., Total Synthesis of the Unusual Cyclosporine Amino-Acid MeBmt. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, (11), 1139-1142.
 32. Aebi, J. D.; Dhaon, M. K.; Rich, D. H., A Short Synthesis of Enantiomerically Pure (2S,3R,4R,6E)-3-Hydroxy-4-Methyl-2-(Methylamino)-6-Octenoic Acid, the Unusual C-9 Amino-Acid Found in the Immunosuppressive Peptide Cyclosporine. *Journal of Organic Chemistry* **1987**, 52, (13), 2881-2886.
 33. Schmidt, U.; Siegel, W., Amino-Acids and Peptides .62. Synthesis of (4R)-4-((E)-2-Butenyl)-4,N-Dimethyl-L-Threonine (Mebmt), the Characteristic Amino-Acid of Cyclosporine. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, (25), 2849-2852.
 34. Wenger, R., Total Synthesis of Cyclosporin and Some Analogs - Structure and Conformational Requirements for Activity. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1985**, 189, (APR-), 13-Medi.
 35. Wenger, R. M., Synthesis of Cyclosporin and Analogs - Structural and Conformational Requirements for Immunosuppressive Activity. *Progress in Allergy* **1986**, 38, 46-8.
 36. Wenger, R. M., Synthesis of Cyclosporine .2. Synthesis of Boc-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-OH, a Part of the Peptide Sequence of Cyclosporine, by Different Strategic Ways and Synthesis of Its Isomers Boc-D-Ala-MeLeu-D-MeLeu-MeVal-OH, Boc-D-Ala-MeLeu-D-MeLeu-D-MeVal-OH, and Boc-D-Ala-MeLeu-MeLeu-D-MeVal-OH as Reference Compounds. *Helvetica Chimica Acta* **1983**, 66, (8), 2672-2702.
 37. Mcdermot.Jr; Benoiton, N. L., N-Methylamino Acids in Peptide Synthesis .4. Racemization and Yields in Peptide-Bond Formation. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1973**, 51, (15), 2562-2570.
 38. Zaoral, M., Amino-Acids and Peptides .36. Pivaloyl Chloride as a Reagent in Mixed Anhydride Synthesis of Peptides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1962**, 27, (5), 1273-8.
 39. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C., Reactions of Peptide Bond .4. Benzotriazonyl-N-Oxytridimethylamino Phosphonium Hexafluorophosphate (BOP). *Tetrahedron Letters* **1975**, (14), 1219-1222.
 40. Wissmann, H.; Kleiner, H. J., New Peptide-Synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1980**, 19, (2), 133-134.
 41. Kovacs, J., *The Peptides* **1980**, 2, 485.
 42. Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R., The Mechanism of Action of Cyclosporine-A and FK506. *Immunology Today* **1992**, 13, (4), 136-142.
 43. Liu, J.; Albers, M. W.; Wandless, T. J.; Luan, S.; Alberg, D. G.; Belshaw, P. J.; Cohen, P.; Mackintosh, C.; Klee, C. B.; Schreiber, S. L., Inhibition of T-Cell Signaling by Immunophilin Ligand Complexes Correlates with Loss of Calcineurin Phosphatase-Activity. *Biochemistry* **1992**, 31, (16), 3896-3901.
 44. Schreiber, S. L., Immunophilin-Sensitive Protein Phosphatase Action in Cell Signaling Pathways. *Cell* **1992**, 70, (3), 365-368.
 45. Ho, S.; Clipstone, N.; Timmermann, L.; Northrop, J.; Graef, I.; Fiorentino, D.; Nourse, J.; Crabtree, G. R., The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clinical Immunology and Immunopathology* **1996**, 80, (3), S40-S45.
 46. Nabel, G. J., A transformed view of cyclosporine. *Nature* **1999**, 397, (6719), 471-472.

47. Hojo, M.; Morimoto, T.; Maluccio, M.; Asano, T.; Morimoto, K.; Lagman, M.; Shimbo, T.; Suthanthiran, M., Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* **1999**, 397, (6719), 530-534.
48. Wenger, R. M., Synthesis of Cyclosporine and Analogs - Structural Requirements for Immunosuppressive Activity. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1985**, 24, (2), 77-85.
49. Eberle, M. K.; Hiestand, P.; Jutzieme, A. M.; Nuninger, F.; Zihlmann, H. R., Preparation and in-Vitro Activities of Ethers of [D-Serine](8)-Cyclosporin. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, (11), 1853-1864.
50. Alberg, D. G.; Schreiber, S. L., Structure-Based Design of a Cyclophilin-Calcineurin Bridging Ligand. *Science* **1993**, 262, (5131), 248-250.
51. Carry, J. C.; Evers, M.; Barriere, J. C.; Bashiardes, G.; Bensoussan, C.; Gueguen, J. C.; Dereu, N.; Filoche, B.; Sable, S.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S., Semisynthetic di- and tri-functionalized non-immunosuppressive cyclosporin A derivatives as potential anti-HIV 1 drugs. *Synlett* **2004**, (2), 316-320.
52. Gordon, K.; Balasubramanian, S., Solid phase synthesis - designer linkers for combinatorial chemistry: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1999**, 74, (9), 835-851.
53. Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J., Use of Peptide-Synthesis to Probe Viral-Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino-Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1984**, 81, (13), 3998-4002.
54. Frank, R.; Heikens, W.; Heisterbergmoutsis, G.; Blocker, H., A New General-Approach for the Simultaneous Chemical Synthesis of Large Numbers of Oligonucleotides - Segmental Solid Supports. *Nucleic Acids Research* **1983**, 11, (13), 4365-4377.
55. Maier, W. F., Combinatorial chemistry - Challenge and chance for the development of new catalysts and materials. *Angewandte Chemie-International Edition* **1999**, 38, (9), 1216-1218.
56. Balkenhohl, F.; vondenBusscheHunnefeld, C.; Lansky, A.; Zechel, C., Combinatorial synthesis of small organic molecules. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1996**, 35, (20), 2289-2337.
57. Gordon, E. M.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gallop, M. A., Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery .2. Combinatorial Organic-Synthesis, Library Screening Strategies, and Future-Directions. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37, (10), 1385-1401.
58. Gallop, M. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gordon, E. M., Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery .1. Background and Peptide Combinatorial Libraries. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37, (9), 1233-1251.
59. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, (14), 2149-8.
60. Merrifield, B., Solid-Phase Synthesis. *Science* **1986**, 232, (4748), 341-347.
61. Bayer, E., Towards the Chemical Synthesis of Proteins. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1991**, 30, (2), 113-129.
62. Wang, S. S., Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide Hydrazides - Preparation and Application of Hydroxymethyl Resin and 3-(P-

- Benzyloxyphenyl)-1,1-Dimethylpropyloxycarbonylhydrazide Resin. *Journal of Organic Chemistry* **1975**, 40, (9), 1235-1239.
63. Mitchell, A. R.; Kent, S. B. H.; Erickson, B. W.; Merrifield, R. B., Preparation of Aminomethyl-Polystyrene Resin by Direct Amidomethylation. *Tetrahedron Letters* **1976**, (42), 3795-3798.
64. Rapp Polymere.
65. Albericio, F.; Pons, M.; Pedroso, E.; Giralt, E., Comparative-Study of Supports for Solid-Phase Coupling of Protected-Peptide Segments. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, 54, (2), 360-366.
66. Dryland, A.; Sheppard, R. C., Peptide-Synthesis .8. A System for Solid-Phase Synthesis under Low-Pressure Continuous-Flow Conditions. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1986**, (1), 125-137.
67. Wang, S. S., Para-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and Para-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *Journal of the American Chemical Society* **1973**, 95, (4), 1328-1333.
68. Rink, H., Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide-Fragments Using a Trialkoxy-Diphenyl-Methylester Resin. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, (33), 3787-3790.
69. Atherton, E.; Bury, C.; Sheppard, R. C.; Williams, B. J., Stability of Fluorenylmethoxycarbonylamino Groups in Peptide-Synthesis - Cleavage by Hydrogenolysis and by Dipolar Aprotic-Solvents. *Tetrahedron Letters* **1979**, (32), 3041-3042.
70. Ueki, M.; Kai, K.; Amemiya, M.; Horino, H.; Oyamada, H., Facile Removal of a Peptide-Chain from a Solid-Phase Resin Support by Hydrolysis Using Tetrabutylammonium Fluoride Trihydrate in N,N-Dimethylformamide. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1988**, (6), 414-415.
71. Atherton, E.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C., Peptide-Synthesis .2. Procedures for Solid-Phase Synthesis Using N-Alpha-Fluorenylmethoxycarbonylamino-Acids on Polyamide Supports - Synthesis of Substance-P and of Acyl Carrier Protein 65-74 Decapeptide. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1981**, (2), 538-546.
72. Randolph, J. T.; McClure, K. F.; Danishefsky, S. J., Major Simplifications in Oligosaccharide Syntheses Arising from a Solid-Phase Based Method - an Application to the Synthesis of the Lewis-B Antigen. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (21), 5712-5719.
73. Danishefsky, S. J.; McClure, K. F.; Randolph, J. T.; Ruggeri, R. B., A Strategy for the Solid-Phase Synthesis of Oligosaccharides. *Science* **1993**, 260, (5112), 1307-1309.
74. Rich, D. H.; Gurwara, S. K., Removal of Protected Peptides from an Ortho-Nitrobenzyl Resin by Photolysis. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1973**, (17), 610-611.
75. Kenner, G. W.; Mcdermot.Jr; Sheppard, R. C., Safety Catch Principle in Solid Phase Peptide Synthesis. *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **1971**, (12), 636-&.
76. Backes, B. J.; Virgilio, A. A.; Ellman, J. A., Activation method to prepare a highly reactive acylsulfonamide "safety-catch" linker for solid-phase synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, (12), 3055-3056.

77. Backes, B. J.; Ellman, J. A., Carbon-Carbon Bond-Forming Methods on Solid Support - Utilization of Kenner Safety-Catch Linker. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, (24), 11171-11172.
78. Link, A.; van Calenbergh, S.; Herdewijn, P., Practical method for the parallel synthesis of 2'-amido-2'-deoxyadenosines. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, (29), 5175-5176.
79. Gayo, L. M.; Suto, M. J., Traceless linker: Oxidative activation and displacement of a sulfur-based linker. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, (2), 211-214.
80. Plunkett, M. J.; Ellman, J. A., A Silicon-Based Linker for Traceless Solid-Phase Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, (19), 6006-6007.
81. Plunkett, M. J.; Ellman, J. A., Germanium and silicon linking strategies for traceless solid-phase synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, (9), 2885-2893.
82. Ko, S. Y.; Wenger, R. M., Solid-phase total synthesis of cyclosporine analogues. *Helvetica Chimica Acta* **1997**, 80, (3), 695-705.
83. Angell, Y. M.; Thomas, T. L.; Flentke, G. R.; Rich, D. H., Solid-Phase Synthesis of Cyclosporine Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (27), 7279-7280.
84. Rich, D. H.; Angell, Y. M.; Malkovsky, M. Immunostimulatory Agents. 5639852, 1997.
85. Rich, D. H.; Angell, Y. M.; Raman, P. Solid phase synthesis of immunosuppressive agents. 5948693, 1999.
86. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A., On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, (27), 4853-4856.
87. Sewald, N., Efficient, racemization-free peptide coupling of N-alkyl amino acids by using amino acid chlorides generated in situ - Total syntheses of the cyclopeptides cyclosporin O and omphalotin A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (24), 4661-4663.
88. Li, P.; Xu, J. C., Total synthesis of cyclosporin O both in solution and in the solid phase using novel thiazolium-, immonium-, and pyridinium-type coupling reagents: BEMT, BDMP, and BEP. *Journal of Organic Chemistry* **2000**, 65, (10), 2951-2958.
89. Fyles, T. M.; Leznoff, C. C., Use of Polymer Supports in Organic-Synthesis .5. Preparation of Monoacetates of Symmetrical Diols. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1976**, 54, (6), 935-942.
90. Frechet, J. M. J.; Haque, K. E., Use of Polymers as Protecting Groups in Organic Synthesis .2. Protection of Primary Alcohol Functional Groups. *Tetrahedron Letters* **1975**, (35), 3055-3056.
91. Frechet, J. M. J.; Nuyens, L. J., Use of Polymers as Protecting Groups in Organic-Synthesis .3. Selective Functionalization of Polyhydroxy Alcohols. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1976**, 54, (6), 926-934.
92. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, I.; Papaioannou, D.; Sotiriou, P., Application of 4-Polystyryltriphenylmethyl Chloride to the Syntheses of Peptides and Amino-Acid Derivatives. *Liebigs Annalen Der Chemie* **1988**, (11), 1079-1081.

93. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Yao, W. Q.; Schafer, W., Synthesis of Protected Peptide-Fragments Using Substituted Triphenylmethyl Resins. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (30), 3943-3946.
94. Eleftheriou, S.; Gatos, D.; Panagopoulos, A.; Stathopoulos, S.; Barlos, K., Attachment of histidine, histamine and urocanic acid to resins of the trityl-type. *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, (14), 2825-2828.
95. Thompson, L. A.; Ellman, J. A., Straightforward and General-Method for Coupling Alcohols to Solid Supports. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, (50), 9333-9336.
96. Koh, J. S.; Ellman, J. A., Palladium-mediated three-component coupling strategy for the solid-phase synthesis of tropane derivatives. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, (14), 4494-4495.
97. Hanessian, S.; Xie, F., Polymer-bound p-alkoxybenzyl trichloroacetimidates: Reagents for the protection of alcohols as benzyl ethers on solid-phase. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, (8), 733-736.
98. Alsina, J.; Chiva, C.; Ortiz, M.; Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F., Active carbonate resins for solid-phase synthesis through the anchoring of a hydroxyl function. Synthesis of cyclic and alcohol peptides. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, (5), 883-886.
99. Kusama, T.; Hayatsu, H., Use of a Derivatized Merrifield Resin for Polymer-Supported Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1970**, 18, (2), 319-&.
100. Leznoff, C. C.; Dixit, D. M., Use of Polymer Supports in Organic-Synthesis .11. Preparation of Monoethers of Symmetrical Dihydroxy Aromatic-Compounds. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1977**, 55, (19), 3351-3355.
101. Panek, J. S.; Zhu, B., Synthesis of aromatic 1,2-diazines by inverse electron demand Diels-Alder reaction of polymer-supported 1,2,4,5-tetrazines. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, (45), 8151-8154.
102. Schore, N. E.; Najdi, S. D., Pauson-Khand Cycloadditions of Polymer-Linked Substrates. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112, (1), 441-442.
103. Kantorowski, E. J.; Kurth, M. J., Solid-phase synthesis of isoxazoles and isoxazolines: En route to a new class of ionophores. *Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, (20), 6797-6803.
104. Kobayashi, S.; Hachiya, I.; Yasuda, M., Aldol reactions on solid phase. Sc(OTf)(3)-catalyzed aldol reactions of polymer-supported silyl enol ethers with aldehydes providing convenient methods for the preparation of 1,3-diol,beta-hydroxy carboxylic acid, and beta-hydroxy aldehyde libraries. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, (31), 5569-5572.
105. Kobayashi, S.; Hachiya, I.; Suzuki, S.; Moriwaki, M., Polymer-supported silyl enol ethers. Synthesis and reactions with imines for the preparation of an amino alcohol library. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, (16), 2809-2812.
106. Cheung, S. T.; Benoiton, N. L., N-Methylamino Acids in Peptide-Synthesis .5. Synthesis of N-Tert-Butyloxycarbonyl, N-Methylamino Acids by N-Methylation. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1977**, 55, (5), 906-910.

107. Mimotopes Pty Ltd., SynPhase Laterns Overview, Schematischer Aufbau der Laternen.
108. Miller, S. C.; Scanlan, T. S., Site-selective N-methylation of peptides on solid support. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, (9), 2301-2302.
109. Gisin, B. F., Monitoring of Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis with Picric Acid. *Analytica Chimica Acta* **1972**, 58, (1), 248-249.
110. Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V., Solid-phase reaction monitoring - Chemical derivatization and off-bead analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, 71, (2), 110-118.
111. Hodges, R. S.; Merrifield, R. B., Monitoring of Solid-Phase Peptide-Synthesis by an Automated Spectrophotometric Picrate Method. *Analytical Biochemistry* **1975**, 65, (1-2), 241-272.
112. Gibson, F. S.; Bergmeier, S. C.; Rapoport, H., Selective Removal of an N-Boc Protecting Group in the Presence of a Tert-Butyl Ester and Other Acid-Sensitive Groups. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, (11), 3216-3218.
113. Angell, Y. M.; Garciaecheverria, C.; Rich, D. H., Comparative-Studies of the Coupling of N-Methylated, Sterically Hindered Amino-Acids During Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, (33), 5981-5984.
114. Albanese, D.; Landini, D.; Lupi, V.; Penso, M., N-monoalkylation of alpha-amino acid esters under solid-liquid PTC conditions. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, (8), 1443-1449.
115. Li, P.; Xu, J. C., 1-Ethyl 2-halopyridinium salts, highly efficient coupling reagents for hindered peptide synthesis both in solution and the solid-phase. *Tetrahedron* **2000**, 56, (41), 8119-8131.
116. Carpino, L. A.; Elfaham, A., Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate - a Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, (19), 5401-5402.
117. Carpino, L. A.; El-Faham, A., The diisopropylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly. *Tetrahedron* **1999**, 55, (22), 6813-6830.
118. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillesen, D., New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (15), 1927-1930.
119. Li, P.; Xu, J. C., HOBt and HOAt-derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, (5), 721-724.
120. Carpino, L. A., 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole - an Efficient Peptide Coupling Additive. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115, (10), 4397-4398.
121. Carpino, L. A.; Elfaham, A., Effect of Tertiary Bases on O-Benzotriazolyluronium Salt-Induced Peptide Segment Coupling. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, (4), 695-698.
122. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C. W.; Lee, Y. S.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mugge, C.; Wenschuh, H.; Klose, K.; Beyermann, M.; Bienert, M., The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: Finally the true uronium salts. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (3), 442-445.

123. Auvinguette, C.; Frerot, E.; Coste, J.; Rebuffat, S.; Jouin, P.; Bodo, B., Z-Gln(Trt)-Aib-Aib-Aib-OMe Synthesis Using Unca and BOP PyBroP Coupling Methods. *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, (15), 2481-2482.
124. Coste, J.; Frerot, E.; Jouin, P.; Castro, B., Oxybenzotriazole Free Peptide Coupling Reagents for N-Methylated Amino-Acids. *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, (17), 1967-1970.
125. Frerot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M. N.; Jouin, P., PyPOP and PyBroP - 2 Reagents for the Difficult Coupling of the Alpha,Alpha-Dialkyl Amino-Acid, Aib. *Tetrahedron* **1991**, 47, (2), 259-270.
126. Carpino, L. A.; Elfaham, A.; Albericio, F., Efficiency in Peptide Coupling - 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole Vs 3,4-Dihydro-3-Hydroxy-4-Oxo-1,2,3-Benzotriazine. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, (11), 3561-3564.
127. Carpino, L. A.; Xia, J. S.; El-Faham, A., 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-5-azabenzotriazin-2-one. *Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, (1), 54-61.
128. Falchi, A.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Taddei, M., 4-(4,6-dimethoxy[1,3,5]triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride (DMTMM): A valuable alternative to PyBOP for solid phase peptide synthesis. *Synlett* **2000**, (2), 275-277.
129. Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G., Triphosgene as highly efficient reagent for the solid-phase coupling of N-alkylated amino acids - total synthesis of cyclosporin O. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, (28), 5013-5016.
130. Edman, P.; Begg, G., A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry* **1967**, 1, (1), 80-8.
131. Edman, P., Mechanism of the Phenyl Isothiocyanate Degradation of Peptides. *Nature* **1956**, 177, (4510), 667-668.
132. Mehta, A.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Douglas, K. T., Improved Efficiency and Selectivity in Peptide-Synthesis - Use of Triethylsilane as a Carbocation Scavenger in Deprotection of Tert-Butyl Esters and Tert-Butoxycarbonyl-Protected Sites. *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, (37), 5441-5444.
133. Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A., Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic-Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (21), 2739-2742.
134. Brinkman, H. R.; Landi, J. J.; Paterson, J. B.; Stone, P. J., The Use of Para-Toluenesulfonic Acid for Removal of the N-Tert-Butoxycarbonyl Protecting Group in Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Synthetic Communications* **1991**, 21, (3), 459-465.
135. Ikota, N.; Shioiri, T.; Yamada, S. I., Amino-Acids and Peptides .30. Phosphorus in Organic-Synthesis .17. Application of Diphenyl Phosphorazidate (DPPA) and Diethyl Phosphorocyanidate (DEPC) to Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1980**, 28, (10), 3064-3069.
136. Yamada, S. I.; Ikota, N.; Shioiri, T.; Tachibana, S., Diphenyl Phosphorazidate (DPPA) and Diethyl Phosphorocyanidate (DEPC) - 2 New Reagents for Solid-Phase Peptide-Synthesis and Their Application to Synthesis of Porcine Motilin. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, 97, (24), 7174-7175.

Dipl. Chem. Andreas Gerber

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation „Totalsynthese von Cyclosporin A an der Festphase“ nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Universität und keiner anderen Fakultät der Universität Basel eingereicht habe.

Riehen, den 24. November 2008

(Andreas Gerber)

An meiner Ausbildung an der Universität Basel waren folgende Dozenten beteiligt:

M. Bruhn, H. Burkhart, E. Constable, F. Gerson, G. Gescheidt, B. Giese, P. C. Hauser, C. Housecroft, H. Huber, T. A. Kaden, H. Kraft, J. P. Maier, W. Meier, W. Müller, M. Neuburger-Zehnder, M. Oehme, A. Pfaltz, H. Rudin, G. Schatz, H. Schierenbeck, P. W. Schiess, H. G. Seiler, U. Séquin, H. Sigel, P. Strazewski, T. Studer, L. Tauscher, H.-J. Vogt, H. Wennemers, T. Wirth, J. Wirz, W.-D. Woggon, A. D. Zuberbühler.